



**HAL**  
open science

# Effets de l'hypoxie respiratoire sur les progéniteurs médullaires dans un modèle murin d'hypodynamie : intérêt pour la réparation osseuse

Marjorie Durand

► **To cite this version:**

Marjorie Durand. Effets de l'hypoxie respiratoire sur les progéniteurs médullaires dans un modèle murin d'hypodynamie : intérêt pour la réparation osseuse. Médecine humaine et pathologie. Université Paris Sud - Paris XI, 2013. Français. NNT : 2013PA11T093 . tel-01124198

**HAL Id: tel-01124198**

**<https://theses.hal.science/tel-01124198>**

Submitted on 6 Mar 2015

**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.



UNIVERSITE PARIS-SUD

ÉCOLE DOCTORALE DE CANCEROLOGIE

*Discipline Biologie, Médecine et Santé*

**THÈSE DE DOCTORAT SUR TRAVAUX**

soutenue le 18/12/2013 à l'Ecole du Val-de-Grâce

par

**Marjorie DURAND**

**Effets de l'hypoxie respiratoire sur les progéniteurs  
médullaires dans un modèle murin d'hypodynamie :  
Intérêt pour la réparation osseuse**

**Directeur de thèse :**

**Dr Marie-Caroline Le Bousse-Kerdilès**

Directeur de Recherche Inserm unité 972, Hôpital Paul Brousse, Villejuif.

**Co-directeur de thèse :**

**Dr Xavier Holy**

Chef du Département des Services, Institut de recherche Biomédicale des Armées, Brétigny-sur-Orge.

**Composition du jury :**

*Président du jury :*

**Pr Olivier Hermine**

PUPH, Hôpital Necker, Paris.

*Rapporteurs :*

**Dr Hervé Petite**

Directeur de Recherche UMR7052, Paris.

**Dr Nathalie Rochet**

Chargée de Recherche INSERM 1091, Nice.

*Examineurs :*

**Dr Katleen Van Damme**

Chargée de Recherche, Leuven.

**Pr François-Xavier Gunepin**

Chirurgien orthopédique, Lorient.

*Membres invités :*

**Pr Jean-Jacques Lataillade**

Professeur Agrégé du Val-de-Grâce, CTSA, Clamart.

## Résumé

La réparation osseuse est assurée par le recrutement constant de cellules souches/progéniteurs ostéo-compétents de nature hématopoïétique (CSH/PH), et mésenchymateuse (CSM). Une approche prometteuse pour le traitement des défauts osseux graves consisterait à favoriser le recrutement et la mobilisation des CSH/PH et des CSM à partir de la moelle osseuse vers le site de lésion. Plusieurs facteurs environnementaux sont connus pour moduler la prolifération, la mobilisation et la différenciation des progéniteurs ostéocompétents, dont l'hypoxie et l'hypodynamie (absence de contraintes mécaniques). Le but de ce travail de thèse a été d'investiguer *in vivo* l'impact de l'hypoxie respiratoire et de l'absence de contraintes mécaniques, appliquées séparément ou ensemble sur i) la mobilisation des progéniteurs ostéocompétents et sur ii) la réparation d'un défaut osseux cavitaires fémoral chez la souris.

Sur un modèle murin dépourvu de défaut osseux, nos données montrent que l'hypoxie respiratoire est un agent mobilisateur des progéniteurs ostéocompétents, et qu'elle pourrait donc potentiellement exercer des effets bénéfiques sur la réparation osseuse. Toutefois, les effets de l'hypoxie sont modulés selon le statut hypodynamique ou non de l'animal. L'absence de contraintes mécaniques limite la mobilisation des progéniteurs érythrocytaires et mésenchymateux initiée par l'hypoxie, suggérant un effet potentiellement délétère de l'hypodynamie en condition hypoxique dans le contexte de la réparation osseuse.

Chez les souris opérées, nous confirmons que l'hypoxie respiratoire déclenchée lors des phases de remodelage améliore la réparation du défaut osseux cavitaires. Une mobilisation des progéniteurs mésenchymateux et hématopoïétiques du fémur contra-latéral vers le fémur opéré est noté, mais le mode d'action de l'hypoxie passerait plutôt par une accélération du mécanisme de réparation dans la zone lésée. De façon intéressante, nous montrons que l'hypodynamie ne diminue pas le bénéfice apporté par l'hypoxie respiratoire à la réparation osseuse.

En conclusion, ce travail de thèse identifie l'hypoxie respiratoire comme un candidat thérapeutique pertinent pour l'amélioration de la réparation osseuse. Bien que la perte des contraintes mécaniques module la biologie des cellules ostéoprogénitrices en absence de lésion, l'hypodynamie ne semble pas influencer la consolidation osseuse dans le cadre d'une amélioration de la réparation par un épisode hypoxique tardif.

## **Abstract**

Many environmental factors are known to influence bone cell fate, including proliferation, mobilization and differentiation of osteoprogenitor cells deriving from both hematopoietic and mesenchymal lineages. Among these factors, hypoxia and unloading (lack of mechanical loading / hypodynamia) are of particular interest. This study aims at investigating the impact of short-term hypobaric hypoxia and hindlimb unloading applied alone or in combination i) on the mobilization of osteocompetent progenitor cells on mice and ii) on the healing in a mouse model of surgical metaphyseal bone defect.

In mice free of bone defect, our data indicate that respiratory hypobaric hypoxia acts as a mobilizing stimulus for osteoprogenitor cells. However, the effects of hypoxia in the bone marrow depend on whether mice are subjected to hindlimb unloading or not: hypodynamia tends to restrain the mobilization of both mesenchymal and erythroid progenitors under hypoxia. This suggests a potential detrimental influence of hypodynamia in the course of bone healing in hypoxic condition.

In mice with surgery, we showed that hypobaric hypoxia during the remodelling process strongly enhances bone healing. A mobilization of both mesenchymal and hematopoietic progenitors is detected from the contralateral femur to the operated femur. In the lesion area, an acceleration of the repair process is evidenced. Interestingly, hindlimb unloading does not exert any negative influence on bone repair in our animal model.

In conclusion, this study identifies delayed hypobaric hypoxia as a potent candidate to enhance bone healing. Even if unloading exerts significant effects on the biology of osteoprogenitor cells on mice free of bone defect, its influence is not detrimental for bone repair.

## **Table des matières**

<b>Liste des abréviations.....</b>	<b>5</b>
<b>I. Préambule : les traumatismes osseux au sein des Armées .....</b>	<b>7</b>
<b>A. Considérations historique et actuelle .....</b>	<b>7</b>
<b>B. Positionnement du problème .....</b>	<b>9</b>
<b>II. Introduction .....</b>	<b>15</b>
<b>A. Le tissu osseux : un système complexe .....</b>	<b>15</b>
1. Fonctions du tissu osseux.....	15
2. Classification des tissus osseux.....	18
3. Anatomie des os longs .....	18
4. Structure des os longs.....	19
5. Composition de l'os.....	21
<b>B. Le tissu osseux : un système dynamique .....</b>	<b>39</b>
1. Remodelage osseux .....	39
2. Réparation osseuse.....	60
3. Concept de niches hématopoïétiques médullaires et interactions cellulaires au sein des niches .....	76
<b>Objectifs.....</b>	<b>86</b>
<b>III. Matériel et Méthodes .....</b>	<b>88</b>
<b>A. Modèles animaux et protocoles expérimentaux .....</b>	<b>88</b>
1. Animaux .....	88
2. Modèle de suspension hypodynamique.....	88
3. Modèle d'hypoxie hypobare .....	89
4. Modèle de défaut osseux cavitaire .....	91
<b>B. Protocoles expérimentaux.....</b>	<b>92</b>
1. Etude des effets croisés de l'hypoxie respiratoire et de l'hypodynamie sur les progéniteurs et des cellules ostéocompétents.....	92
Description du protocole « caisson + suspension ».....	92
2. Etude des effets croisés de l'hypoxie respiratoire et de l'hypodynamie sur les progéniteurs et les cellules ostéocompétents dans le cadre de la réparation osseuse .....	94
Description du protocole « opération + caisson + suspension » .....	94
<b>C. Méthodes d'analyses.....</b>	<b>96</b>
1. Micro-tomographie.....	96
2. Statistiques.....	97
<b>IV. Résultats .....</b>	<b>98</b>
1. Etude des effets croisés de l'hypoxie respiratoire et de l'hypodynamie sur la régulation des progéniteurs et des cellules ostéocompétents. ....	98
2. Etude des effets croisés de l'hypoxie respiratoire et de l'hypodynamie sur les progéniteurs et les cellules ostéocompétents dans le cadre de la réparation osseuse. ....	120
<b>V. Discussion et perspectives .....</b>	<b>163</b>
<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>187</b>
<b>Remerciements.....</b>	<b>216</b>

## Liste des abréviations

<b>Ak Phos</b> : Alkaline Phosphatase	<b>DFO</b> : Desferrioxamine
<b>Ang-1</b> : Angiopoïétine-1	<b>Dkk-1</b> : Dickkopf-1
<b>ARF</b> : Désigne la succession des trois phases principales d'Activation/Résorption/Formation au cours du remodelage osseux	<b>Dlx5</b> : Distal-less homeobox-5,
<b>ARNm</b> : Acide ribonucléique messenger	<b>Dmp-1</b> : Dentin matrix protein-1
<b>ATF4</b> : Activating transcription factor 4	<b>DRO</b> : Reactive Oxygen Species (dérivés réactifs de l'oxygène)
<b>BALP</b> : Mouse Bone-specific Alkaline Phosphatase	<b>Epo</b> : Erythropoïétine
<b>bFGF</b> : Basic Fibroblast-Growth Factor	<b>ePP<sub>i</sub></b> : Pyrophosphates inorganiques extracellulaires
<b>BFU-E</b> : Burst Forming Unit-Erythroid,	<b>ERK1/2</b> : Extracellular Signal-Regulated Kinases 1/2
<b>BGP</b> : Bone Gla Protein ou ostéocalcine	<b>FGF</b> : Fibroblast Growth Factors
<b>BM-40</b> : Basement Membrane protein of 40 kDa ou ostéonectine	<b>FI02</b> : Fraction en dioxygène dans les gaz inspirés
<b>BMPs</b> : Bone Morphogenetic Proteins	<b>Flt-IgG</b> : Récepteurs solubles
<b>BMU</b> : Basic Multicellular Unit	<b>GaGs</b> : Glycosaminoglycanes
<b>BSA</b> : Bovine serum albumin	<b>Gas-6</b> : Growth arrest-specific gene 6
<b>BSP</b> : Bone Sialoprotein	<b>G-CSF</b> : Granulocyte-colony stimulating factor
<b>BV/TV</b> : bone volume/tissue volume ( <i>pourcentage de la surface de tissu osseux / surface de tissu</i> )	<b>GDFs</b> : Growth and Differentiation Factors
<b>Ca</b> : Calcium	<b>GFP</b> : Green fluorescence protein
<b>CA9</b> : Carbonic Anhydrase 9	<b>Gla</b> : Résidus d'acide $\gamma$ -carboxyglutamique
<b>CAR</b> : CXCL12 abundant reticular cells	<b>GLUTs</b> : Glucose transporters
<b>Cbfa1</b> : Core binding factor $\alpha$ 1 protein	<b>GM-CSF</b> : Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor
<b>CBP</b> : CREB-binding protein	<b>gp130</b> : Glycoprotéine de la famille du récepteur à l'IL-6
<b>CD</b> : Cluster of Differentiation (ex : CD90, CD105, CD11b)	<b>GPC4</b> : Glypican 4
<b>CFC</b> : Colony Forming Cells	<b>GPM</b> : Gla-protéine matricielle
<b>c-fos</b> : Facteur de transcription	<b>GR</b> : Globules rouges
<b>CFU</b> : Colony Forming Unit	<b>GTPase</b> : Guanosine Triphosphatase
<b>CFU-E</b> : Colony Forming Unit-Erythroid	<b>HAP</b> : Hydroxyapatite
<b>CFU-G</b> : Colony Forming Unit-Granulocytes	<b>HGF</b> : Hepatocyte Growth Factor
<b>CFU-GEMM</b> : Colony-Forming Unit-Granulocyte, Erythrocyte, Macrophage, Megakaryocyte	<b>HIF</b> : Hypoxia Inducible Factor
<b>CFU-GM</b> : Colony Forming Unit-Granulocyte Macrophage	<b>HLA-DR</b> : Human Leukocytes Antigen du Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe II
<b>CFU-M</b> : Colony Forming Unit-Macrophages	<b>HRE</b> : Hypoxia Responsive Element
<b>CFU-Meg</b> : Colony Forming Unit-Megakaryocyte	<b>IFN-<math>\beta</math></b> : Interféron $\beta$
<b>CFU-S</b> : Colony Forming Unit in Spleen	<b>IGF</b> : Insulin -like growth factors
<b>c-kit</b> : Protooncogène	<b>lhh</b> : Indian Hedgehog
<b>CIC7</b> : Canal chlore	<b>IL-1</b> : Interleukine-1
<b>Col I</b> : Collagène de type I	<b>IL-6</b> : Interleukine-6
<b>COP</b> : Cellules ostéoprogénitrices circulantes	<b>IMDM</b> : Iscove's Modified Dulbecco's Media (milieu de culture cellulaire)
<b>COX-2</b> : Cyclooxygénase-2	<b>INF-<math>\gamma</math></b> : Interféron $\gamma$
<b>CSH/PH</b> : Cellules Souches et Progéniteurs Hématopoïétiques	<b>iNOS</b> : Inducible Nitric Oxide Synthase
<b>CSM</b> : Cellules Souches/Progéniteurs Mésoenchymateux	<b>IP3</b> : 3-Phosphatidyl Inositol
<b>CSH</b> : Cellules souches hématopoïétiques	<b>iPP<sub>i</sub></b> : Pyrophosphates intracellulaires
<b>CSM</b> : Cellules souches mésoenchymateuses	<b>JAK-STAT</b> : Janus Kinase (tyrosine kinase) – Signal Transducer and Activator of Transcription
<b>CTR</b> : Calcitonin Receptor	<b>Kit</b> : Tyrosin Protein Kinase (CD117)
<b>CTX</b> : Cross Linked C-Telopeptide of type I collagen	<b>KLS</b> : Cellules CSH/PH Kit <sup>+</sup> Lin <sup>-</sup> Sca <sup>-</sup>
<b>CXC-12</b> : Chimiokine SDF-1	<b>KLSCD150</b> : Cellules CSH/PH Kit <sup>+</sup> Lin <sup>-</sup> Sca <sup>+</sup> CD150 <sup>+</sup>
<b>CXCR4</b> : Alpha chemokine receptor specific for stromal-derived-factor-1	<b>LB</b> : Lymphocyte B
	<b>Lin</b> : Marqueurs Lineage
	<b>LRP5</b> : Low-density lipoprotein-Receptor related
	<b>LT</b> : Lymphocyte T

**LT-CIC** : Long-Term-Culture Initiating Cell  
**LT-RC** : Long-Term Repopulating Cells  
**MAPK** : Mitogen Activated Protein Kinase  
**Mcp 1** : Monocyte chemotactic protein 1  
**M-CSF** : Macrophage-Colony Stimulating Factor  
**Mepe** : Matrix extracellular phosphoglycoprotein  
**mEPO** : EPO murine  
**Micro-CT** : Micro-Computed Tomography  
**mim-1** : myb-induced myeloid protein-1  
**MIP 1 $\alpha$**  : Macrophage inflammatory protein-1 alpha  
**Mitf** : Microphthalmia-associated Transcription Factor  
**MMPs** : Matrix-MetalloProteinases  
**MMP-9** : Matrix-MetalloProteinase-9  
**Mo** : Monocytes  
**MSCs** : Cellules stromales mésenchymateuses  
**Msx2** : Msh homeobox homolog-2  
**Myc** : Oncogène  
**MyoD** : Facteur de transcription  
**N-Cad** : N-Cadhérite  
**NFATc1** : Nuclear Factor of Activated T-cells 1  
**NF $\kappa$ B** : Nuclear Factor kappa B (facteur de transcription)  
**NK** : Natural Killer  
**NO** : Nitric Oxide  
**O<sub>2</sub>** : Dioxygène  
**Ob** : Ostéoblaste  
**OC** : Ostéocalcine  
**Oc** : Ostéoclaste  
**OCIL** : Osteoclast Inhibitory Lectin  
**OMI** : Ostéoporose maligne infantile  
**ON** : Ostéonectine  
**OP ou OPN** : Ostéopontine  
**OPG** : Ostéoprotégérine  
**Osteomacs** : Osteal Macrophages  
**PAL** : Phosphatase Alcaline  
**PBS** : Phosphate-Buffered Saline  
**PDGF BB** : B polypeptide chain Platelet-Derived Growth Factor  
**PECAM** : Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule  
**PG** : Protéoglycanes  
**PGE2** : Prostaglandine E2  
**PH** : Progéniteurs de nature hématopoïétique  
**PHD** : Prolyhydroxylases  
**P<sub>i</sub>** : Ions phosphates inorganiques  
**PKC** : Protéine Kinase C  
**PN** : Polynucléaires,  
**PNC** : Protéines non collagéniques  
**pO<sub>2</sub>** : Pression partielle en oxygène de l'air inspiré

**pOb** : Progéniteurs d'ostéoblastes  
**pOc** : Progéniteurs d'ostéoclastes  
**PPAR $\gamma$ 2** : Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ 2  
**PSN** : Pénicilline, Streptomycine, Néomycine  
**PTH** : ParaThyroid Hormone  
**PTHr** : PTH receptor  
**PTHrP** : Parathyroid Hormone-related Protein  
**PU-1** : Facteur de transcription  
**RANK** : Receptor Activator of NF $\kappa$ B  
**RANK-L** : Receptor Activator of NF $\kappa$ B Ligand  
**Ras** : Gène codant une petite protéine G (activité GTPase)  
**RGD** : Arginine, Glycine, Asparagine  
**rhEPO ( $\alpha$  ou  $\beta$ )** : EPO recombinante humaine (de type  $\alpha$  ou  $\beta$ )  
**RhoA** : Ras Homolog gene family, member A (activité GTPase)  
**ROI** : Region of Interest  
**Runx2** : Runt-related transcription factor 2  
**S1P** : Sphingosine 1-phosphatase  
**SCF** : Stem Cell Factor  
**SDF-1( $\alpha$ )** : Stromal Cells-Derived Factor-1( $\alpha$ )  
**SH** : Suspension-Hypoxique  
**Shh** : Sonic-Hedgehog  
**SIBLINGs** : Small Integrin-Binding Ligand N-linked Glycoproteins  
**SLRP** : Small Leucin-Rich Proteoglycan  
**SN** : Suspension-Normoxique  
**SOST** : Sclerostin  
**Sox9** : Facteur de transcription  
**SPARC** : Secreted Protein Acidic and Rich in Cystein ou ostéonectine  
**SRC** : SCID Repopulating Cells  
**ST-RC** : Short-Term Repopulating Cells  
**SVF** : Sérum de veau foetal  
**TGF- $\beta$**  : Transforming Growth Factor-Bêta  
**TH** : Témoin-Hypoxique  
**TN** : Témoin-Normoxique  
**TNF- $\alpha$**  : Tumor necrosis factor alpha  
**TRANCE** : RANK-L  
**TRAP** : Tartrate-Resistant Acid Phosphatase  
**VDR** : Vitamin D Receptor  
**VE-cadherin** : Vascular Endothelial-cadherin  
**VEGF** : Vascular Endothelial Growth Factor  
**VHL** : Protéine Von Hippel-Lindau  
**Wnt** : Famille de glycoprotéines impliquées dans la signalisation cellulaire  
**WT** : Phénotype wild-type (phénotype sauvage)

Ce Doctorat a été réalisé au sein de l'Institut de Recherche Biomédicale des Armées (IRBA), en étroite collaboration avec l'unité 972 de l'INSERM et le Centre de Transfusion Sanguine des Armées (CTSA) dans le cadre du contrat d'objectif 10 CA201 et du PEA 07.08.01 de la Direction Générale de l'Armement.

Les programmes de recherche développés au sein de l'IRBA répondent à une mission duale au service des forces et de la Nation. Ces recherches concernent le soutien sanitaire en opération, la prévention et la protection du militaire face aux menaces de son environnement ainsi que les soins à apporter au combattant.

Le département du « Soutien Médico-Chirurgical des Forces », dirigé par le Médecin Chef Jean-Jacques Lataillade, œuvre pour l'amélioration de la prise en charge thérapeutique des blessures de guerre dont les traumatismes osseux graves.

## **I. Préambule : les traumatismes osseux au sein des Armées**

### ***A. Considérations historique et actuelle***

Avant l'apparition des armes à feu sur le champ de bataille, les plaies provoquées par armes blanches, bien qu'effroyables, ne posaient que rarement la question de l'amputation traumatique d'un membre (Manring, Hawk et al. 2009). Les blessures infligées par les épées, dagues, lances, et autres objets tranchants sont en effet nettes et relativement peu dévastatrices pour les membres. L'atteinte osseuse, lorsqu'elle était présente, était rarement grave. Dans ce contexte les amputations sont plutôt consécutives au développement d'une infection ou gangrène au niveau du membre accidenté et mal soigné. Mais l'introduction des armes à feu sur le champ de bataille dès le 14<sup>ème</sup> siècle en Europe a considérablement modifié la donne. Apparaissent alors des blessures par balles, boulets et mitrailles qui provoquent des plaies profondes avec un délabrement tissulaire important. Les fracas osseux associés multiplient les indications d'amputation traumatique (Kirkup 1995). Bien codifié, l'apprentissage de cette technique a constitué pendant très longtemps la base de l'enseignement des médecins militaires. Ainsi, dans ses mémoires, le Chirurgien en Chef



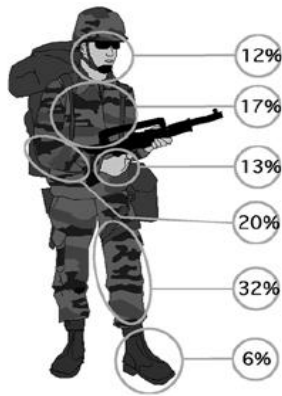
de la Grande Armée, Dominique Larrey se targue de pratiquer une amputation d'un membre inférieur en 4 minutes et celle d'un bras en une dizaine de secondes.

Lors de la première guerre mondiale, les balles et les fusils sont délaissés au profit des obus, des mines et des grenades. Ainsi, sur 20 000 grands blessés de la bataille de Verdun, 17 000 le sont par éclats d'obus, contre 1 200 par des balles (Mignon 1927; Chauvin, Fischer et al. ). Ce changement dans l'emploi des agents vulnérants modifie la gravité des atteintes osseuses. Les blessés par éclats d'obus sont presque toujours polycrèlés. Les plaies communiquent largement avec le milieu extérieur, et les lésions osseuses observées sont associées à des pertes importantes de substance (Ferrandis and Ségal 2009). C'est à cette époque que le terme « chirurgie orthopédique de guerre » est introduit par le Médecin chef Jean-François Calot.



**Photographie I-1 : Amputation de la cuisse lors de la première guerre mondiale (novembre 1914).**  
Plaie pénétrante par éclats d'obus.

Les guerres menées aujourd'hui ont évolué. Les conflits contemporains, dits asymétriques ou non conventionnels, s'éloignent du schéma historique d'affrontement entre deux armées régulières. Sans véritable front, ces conflits opposent des belligérants au niveau de pouvoir résolument différent. Un belligérant « faible » recherche l'avantage stratégique par le contournement de la supériorité technologique de l'adversaire « fort » en utilisant des solutions et des moyens alternatifs (Metz 2003). Les agents lésionnels utilisés sont principalement des engins explosifs improvisés, des mines et de tirs de mortiers. Le port des effets de protection individuelle a permis de réduire les atteintes, souvent mortelles, de la tête et du tronc. En revanche, les membres restent toujours très exposés puisque leurs



**Figure I-1 : Fréquence des localisations des blessures par armes à feu au sein des Armées françaises (d'après Haus-Cheymol, 2011)**

lésions représentent 70 % des blessures totales (38 % pour les membres inférieurs et 31 % pour les membres supérieurs, (Haus-Cheymol R, C. Bouguerra et al. 2011). Les atteintes balistiques multiples et les projections de fragments (polycrissage) dues aux engins explosifs sont responsables de **fracas osseux majeurs avec perte de substance**, pour lesquels les mécanismes naturels de la réparation osseuse sont inefficaces. Une étude rétrospective américaine récente stipule que les blessures de guerre d'ordre orthopédique représentent la principale cause d'invalidité et de handicap chez les vétérans des guerres irakiennes (Cross, Johnson et al. 2011). L'étude

appuie également sur le fardeau économique que constituent ces blessures. En 2009, au sein des Armées Françaises, on estime que 16% des interventions chirurgicales de l'avant sont des amputations (Donat, Clapson et al. 2009).

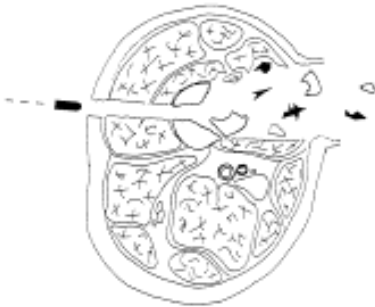
## ***B. Positionnement du problème***

Un traumatisme balistique se définit comme un transfert d'énergie entre un projectile en mouvement (balle, éclat d'obus,...) et l'organisme. Plus l'énergie du transfert est élevée, plus les lésions associées sont graves. Le transfert d'énergie est fonction de nombreux facteurs, dont notamment :

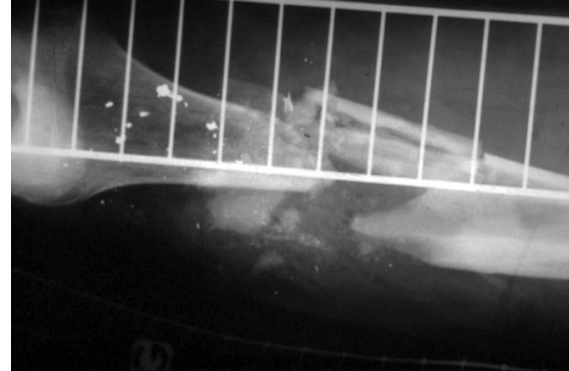
- l'énergie initiale du projectile. Elle est proportionnelle à la moitié de sa masse et au carré de sa vitesse ( $E = 1/2 mV^2$ ). Les projectiles à haute vitesse possèdent le pouvoir vulnérant le plus puissant.
- de la nature du projectile et de sa composition qui déterminent sa capacité à s'écraser ou à se fragmenter.
- de la densité et l'élasticité des tissus concernés par le traumatisme. Plus la densité des tissus est élevée et leur élasticité faible, plus le transfert d'énergie est important.

Les structures osseuses sont les structures les plus denses de l'organisme et sont de fait le siège d'un transfert d'énergie élevé. Comme illustré par la figure I-2, l'énergie libérée lors du contact os/projectile fracasse littéralement la pièce osseuse en générant de multiples fragments. On assiste à la création de **fractures ouvertes** (le foyer de fracture communique

avec l'environnement extérieur) **comminutives** (produisant de multiples fragments) et **associées à des pertes de substance osseuse**.



**Figure I-2 : Trajet balistique d'une balle à fragmentation** De multiples fragments osseux sont générés sur le trajet de la balle.



**Photographie I-2 : Radiographie d'une lésion osseuse balistique** (cliché en provenance de l'Hôpital d'Instruction des Armées de Percy-Clamart). Notez la perte importante de substance osseuse et la présence de fragments.

La classification des fractures ouvertes d'après Ramon Gustilo et Anderson (tableau I-1) place les lésions balistiques dans le grade le plus élevé des fractures ouvertes.

**Classification of open fractures**

Type	Wound	Level of contamination	Soft tissue injury	Bone injury
I	<1 cm long	Clean	Minimal	Simple, minimal comminution
II	>1 cm long	Moderate	Moderate, some muscle damage	Moderate comminution
III*				
A	Usually >10 cm long	High	Severe, with crushing	Usually comminuted soft tissue coverage of bone possible
B	Usually >10 cm long	High	Very severe loss of coverage	Bone coverage poor; usually requires reconstructive surgery of soft tissue
C	Usually >10 cm long	High	Very severe loss of coverage plus vascular injury requiring repair	Bone coverage poor; usually requires reconstructive surgery of soft tissue

\*Segmental fractures, farmyard injuries, fractures occurring in a highly contaminated environment, shotgun wounds, or high-velocity gunshot wounds are automatically classified as type III open fractures.

**Tableau I-1: Classification des fractures ouvertes de Gustilo et Anderson d'après (Wraighte and Scammell 2007)**

Pour les pertes de substance modérées, l'ostéogénèse à partir des bouts osseux parvient à combler l'espace inter-fragmentaire. La réparation osseuse est assurée par le recrutement de cellules souches/progénérateurs de nature hématopoïétique (CSH/PH) et mésenchymateuse

(CSM). Au cours de la réparation, ces progéniteurs résidant dans la moelle osseuse au sein de niches environnementales sont mobilisés jusqu'au site de lésion où ils se différencient. Les CSH/PH se différencient notamment en ostéoclastes, responsables de la résorption osseuse, et en globules blancs qui interviennent dans le processus inflammatoire. Les CSM sont quant à elles à l'origine des ostéoblastes impliqués dans la formation osseuse. Chez l'homme, les mécanismes de cicatrisation et de remodelage osseux qui sont spontanément mis en jeu permettent une consolidation des fractures dans un délai 45 à 90 jours selon la pièce osseuse (Colton, Dell'Oca et al. 2000). Mais lorsque le volume de la perte de substance dépasse une valeur critique, les mécanismes de cicatrisation et de remodelage sont mis à mal. Même si un traitement orthopédique de stabilisation de la fracture intervient (pose d'un fixateur externe par exemple), le pontage osseux de la zone de résection ne peut avoir lieu. A la place, un tissu de comblement fibreux s'interpose entre les deux fragments non-unis. Des recherches ont été menées chez de nombreuses espèces afin de déterminer la distance critique à partir de laquelle la consolidation des deux bouts osseux ne peut se faire. Les études s'accordent pour fixer cette distance aux environs de 1,4 à 2 fois le diamètre diaphysaire moyen de l'os considéré (Key 1934; Volpon 1994). Cette non-consolidation osseuse se nomme pseudo-arthrose.

La prise en charge thérapeutique des fracas osseux avec perte de substance représente toujours un défi pour le chirurgien orthopédique. Il s'agit de combler le défaut osseux avec un matériau correctement toléré par le patient et qui possède des propriétés pouvant favoriser la consolidation. Idéalement, ce matériau serait à la fois **ostéo-conducteur** et **ostéo-inducteur** (Giannoudis, Dinopoulos et al. 2005). L'ostéo-conduction d'un matériau de comblement dépend largement de ses propriétés de surface et de l'interface établie avec le tissu hôte. Elle désigne la capacité du matériau à permettre l'adhésion et la migration des cellules en son sein ainsi que sa capacité à autoriser le dépôt de tissu osseux sans interposition fibreuse (Giannoudis, Dinopoulos et al. 2005). L'ostéo-induction fait référence à la capacité du matériau à recruter des cellules indifférenciées de l'hôte et à les orienter vers la voie ostéogénique pour induire la formation d'os (Giannoudis, Dinopoulos et al. 2005).

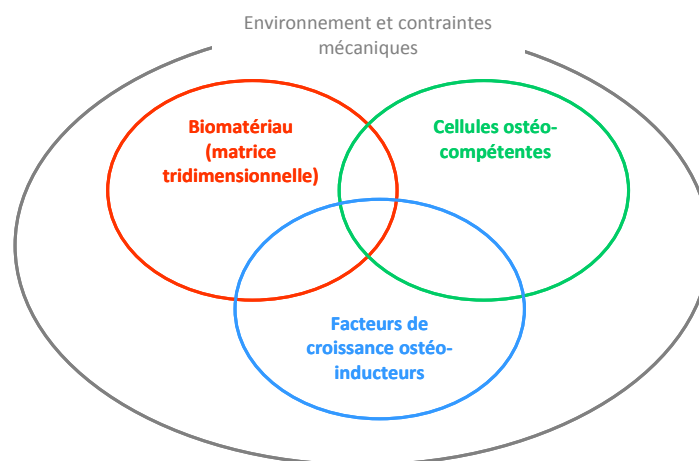
Le procédé de référence utilisé actuellement par le chirurgien orthopédique pour le comblement et la reconstruction des pertes de substance est l'autogreffe de tissu osseux. Brièvement, la technique opératoire consiste à prélever un fragment d'os sur le patient lui-

même, à partir d'un site donneur (la crête iliaque généralement), puis de l'implanter dans la zone lésée (Dimitriou, Mataliotakis et al. 2011). Le greffon osseux autologue est doté de très bonnes propriétés ostéo-conductrices et ostéo-inductrices (surtout lorsqu'il a conservé sa vascularisation) et n'entraîne pas de réaction immunitaire. Ces caractéristiques font de lui un excellent matériau de comblement (Cypher and Grossman 1996). Cependant, malgré son intérêt, la technique présente des limitations sérieuses. Le principal inconvénient réside dans la disponibilité du greffon lui-même : les réserves d'os autologue sont restreintes. Cette technique opératoire n'est donc pas totalement adaptée pour le comblement des grandes pertes de substance. Par ailleurs, le prélèvement de ce type de greffon n'est pas dénué de conséquences et de risques de complications pour le patient. L'existence d'un second site chirurgical au niveau du site donneur augmente la morbidité post-opératoire (Younger and Chapman 1989).

Pour le comblement des pertes de substance de plus grande ampleur, le greffon allogénique constitue une alternative à l'autogreffe osseuse. Issu de déchets opératoires ou prélevé chez un donneur post-mortem, le greffon allogénique présente l'avantage d'être disponible en quantité non limitée. L'inconvénient principal à l'emploi de ce type d'implant provient des nombreux traitements de préparation qu'il subit. Les prélèvements sont soumis à des protocoles de sécurisation bactérienne et virale par stérilisation (irradiation  $\gamma$ , chaleur,...) et subissent également des traitements de congélation dans de l'azote liquide ou de lyophilisation visant à réduire leur immunogénicité (Chatterjea, Meijer et al. 2010). Plusieurs études ont montré que ces protocoles de préparation des greffons allogéniques tendent à altérer leurs propriétés d'ostéo-induction et compromettent l'efficacité de la prise de la greffe et de la réparation (Finkemeier 2002).

Les greffes autologues et allogreffes restent à l'heure actuelle des techniques de choix indiquées dans le comblement des grandes pertes de substance osseuse. Toutefois, les limites liées à leur utilisation ont largement contribué à la recherche sur des matériaux de substitution d'origine non osseuse, les biomatériaux. Les premières tentatives d'emploi des biomatériaux remontent au 19<sup>ème</sup> siècle (Ollier 1872; Gluck 1891), mais leur utilisation clinique ne s'est vraiment développée que depuis une quinzaine d'années (Schwartz 2010). Différents types de substituts sont disponibles sur le marché. Brièvement, on distingue les céramiques à base de phosphate de calcium (hydroxyapatite par exemple) ou de carbonate de calcium (exosquelette de corail de genre Porites) et les matériaux polymères (Burg, Porter

et al. 2000). Ces derniers peuvent être d'origine naturelle, comme les polysaccharides (pullulane, chitosane,...) (Venkatesan and Kim 2010), ou de synthèse (poly(lactic acid) PLA par exemple). Les points forts des biomatériaux sont leur excellente biocompatibilité et, à des degrés divers, leur bonne ostéo-conductivité (Cornell 1999). En revanche, leurs propriétés ostéo-inductrices restent limitées. Pour pallier ces insuffisances, se sont développées des stratégies d'ingénierie tissulaire dans lesquelles les biomatériaux sont associés à des composantes ostéo-inductrices de nature cellulaire et/ou chimique. Les principaux acteurs sollicités par ces techniques de reconstruction tissulaire sont résumés dans le « concept du diamant », développé par (Giannoudis, Dinopoulos et al. 2005). Il s'agit de créer un **équivalent de greffon autologue**, sous la forme d'un produit d'ingénierie **biomatériau/cellules ostéocompétentes/facteurs de croissance**, en prenant en compte **l'environnement et les contraintes mécaniques** auxquels l'ensemble est soumis.



**Figure I-3: Concept du diamant**

Concept du diamant résumant les différents acteurs impliqués dans l'ingénierie tissulaire appliquée à l'os (adapté d'après Giannoudis, Dinopoulos et al. 2005)

La recherche sur les cellules ostéocompétentes s'est surtout focalisée sur les CSM, les CSH/PH ayant été étudiées dans une moindre mesure. L'ajout de facteurs de croissance ostéo-inducteurs, tels que les Bone Morphogenic Proteins (BMPs) par exemple, permet de constituer un microenvironnement favorable à l'activation de la fonction des cellules contenues dans la matrice ainsi que celle des cellules de l'hôte.

Le premier essai clinique utilisant des cellules ostéocompétentes autologues associées à un matériau support d'hydroxyapatite a été réalisé par l'équipe de Quarto en 2001. Depuis, de nombreuses études menées sur modèle animal (Kruyt, Dhert et al. 2004; Mankani, Kuznetsov et al. 2006) et chez l'homme (Hibi, Yamada et al. 2006; Lee, Stavropoulos et al. 2010) attestent de la pertinence de cette stratégie de bio-ingénierie dans le traitement des défauts osseux de grande taille. Mais si l'emploi d'équivalents de greffons autologues permet globalement une amélioration de la réparation, la communauté scientifique se heurte à une hétérogénéité importante dans les résultats ; une inconsistance difficile à outrepasser à l'heure actuelle. Parmi les principales difficultés rencontrées figurent la survie des cellules implantées et la maîtrise du microenvironnement favorable à la survie et à la différenciation de ces cellules.

Depuis quelques années, une autre stratégie de recherche s'est développée, fondée sur l'apport jusqu'au site lésé de **cellules ostéocompétentes endogènes** *via* un mécanisme de mobilisation cellulaire. La preuve du concept a été apportée en 2007 par les études du groupe d'Otsuru et celui de Kumagai, qui ont montré que des cellules/progéniteurs ostéocompétents peuvent traverser la barrière endothéliale et circuler par voie sanguine jusqu'au site de lésion osseuse où elles participent à la réparation (Otsuru, Tamai et al. 2007; Kumagai, VasANJI et al. 2008). Dès lors, des études visant à augmenter la mobilisation des progéniteurs ostéocompétents ont été menées, et c'est dans ce contexte que s'inscrit le travail réalisé au cours de ce doctorat.

## **II. Introduction**

### ***A. Le tissu osseux : un système complexe***

#### **1. Fonctions du tissu osseux**

##### **a) Fonction biomécanique**

Le système osseux ou squelette constitue un support rigide, tel une charpente, qui sert de support aux tissus mous. Point d'attache des tendons et des muscles squelettiques, il est aussi impliqué dans la locomotion. Les os sont également une protection des organes vitaux. Ainsi, la boîte crânienne et les vertèbres assurent la protection du cerveau et du système nerveux central tandis que la cage thoracique protège cœur et poumons.

##### **b) Fonction métabolique**

L'os est un tissu très actif sur le plan métabolique. Il joue un rôle central dans le métabolisme phospho-calcique et dans l'équilibre acido-basique de l'organisme.

99 % du calcium et du phosphore de l'organisme se trouvent enfermés dans le squelette sous forme d'hydroxyapatite phosphocalcique. Avec le rein et l'intestin, l'os est la cible d'un système hormonal visant à élever la calcémie. L'hypocalcémie induit une élévation de la sécrétion de deux hormones, la parathormone (PTH) et la vitamine D, qui agissent en synergie pour augmenter l'absorption digestive et la réabsorption tubulaire du calcium. Au niveau osseux, ces deux hormones stimulent la résorption osseuse induisant secondairement un flux de calcium de l'os vers le sang.

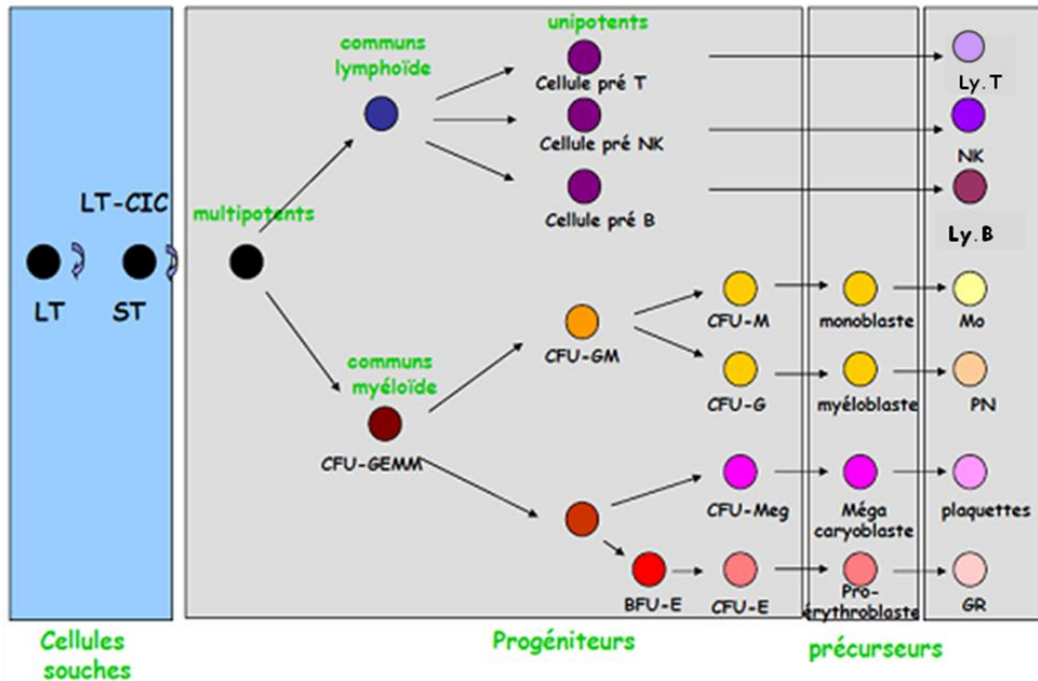
Le pool calcique de l'os peut également jouer un rôle de réserve cationique mobilisable en cas d'acidose. En effet, en cas d'excès d'acidité fixe apparaissant dans l'organisme, l'os est capable de tamponner l'afflux de protons en les échangeant avec les cations calciques.



### c) Fonction hématopoïétique

L'hématopoïèse, du grec *haimatos* « du sang » et *poiesis* « création », se définit comme l'ensemble des mécanismes dynamiques qui assurent la production constante et régulée des différentes lignées sanguines. Chez l'homme adulte, elle a lieu dans la moelle osseuse des os courts et plats, au sein de niches médullaires, microenvironnements spécifiques hautement régulés. On distingue quatre compartiments de l'hématopoïèse (figure II-1). Les trois premiers compartiments sont localisés dans la moelle osseuse, le dernier dans le sang :

- Le compartiment des **cellules souches hématopoïétiques (CSH)**. L'existence des cellules souches hématopoïétiques a été prouvée par les expériences de Till et Mac Culloch au début des années 60 (Till and Culloch 1961). Brièvement, les auteurs ont montré que l'injection de cellules médullaires à des souris irradiées à des doses létales induit le développement de colonies hématopoïétiques au niveau de la rate, chaque colonie provenant d'une cellule souche dite CFU-S (Colony Forming Unit in Spleen). Représentant moins d'un pour cent des cellules de la moelle, (Sutherland, Lansdorp et al. 1990), les CSH sont des cellules très primitives capables d'auto-renouvellement et de différenciation vers l'ensemble des lignées hématopoïétiques.
- Le compartiment des **progéniteurs**. Les progéniteurs sont capables de proliférer et se différencier vers les lignées lymphoïde et myéloïde.
- Le compartiment des **précurseurs**. Reconnaissables morphologiquement sur un myélogramme, ces cellules correspondent au compartiment de multiplication et de maturation terminale de l'hématopoïèse. Elles constituent la descendance des progéniteurs monopotents, et acquièrent progressivement, au cours de leurs divisions successives, les caractères spécifiques les rapprochant peu à peu des cellules terminales des différentes lignées sanguines.
- Le compartiment des **cellules matures** : A la fin du processus de maturation, les cellules fonctionnelles passent la barrière médullaire en traversant les cellules endothéliales (phénomène de diapédèse) et pénètrent dans la circulation sanguine.



**Figure II-1 : Organisation de l'hématopoïèse**

Abréviations : **LT-CIC** : Long-Term-Culture Initiating Cell (LT : long term, ST : short term), **CFU-GEMM** : Colony-Forming Unit-Granulocyte, Erythrocyte, Macrophage, Megakaryocyte, **CFU-GM** : Colony Forming Unit-Granulocyte Macrophage, **CFU-M** : Colony Forming Unit-Macrophages, **CFU-G** : Colony Forming Unit-Granulocytes, **BFU-E** : Burst Forming Unit-Erythroid, **CFU-E** : Colony Forming Unit-Erythroid, **CFU-Meg** : Colony Forming Unit-Megakaryocyte, **Mo** : monocytes, **PN** : polynucléaires, **GR** : globules rouges, **Ly.T** : Lymphocyte T, **NK** : Natural Killer, **Ly.B** : Lymphocyte B

Les cellules matures peuvent être identifiées morphologiquement. *A contrario*, l'identification des cellules souches et des progéniteurs ne peut pas se faire par des méthodes cytologiques. Leur caractérisation est réalisée à l'aide de tests *in vivo* et *in vitro*.

Pour l'identification *in vivo* des cellules du compartiment souche, les tests les plus couramment utilisés sont les **CFU-S** chez la souris (Siminovitch, McCulloch et al. 1963) et les **SRC** (SCID Repopulating Cells") (Bhatia, Bonnet et al. 1998). Ce test est basé sur la reconstitution de l'hématopoïèse à court ou à long terme après greffe de cellules chez la souris immunodéprimée de type SCID.

Parmi les tests fonctionnels *in vitro*, citons le test **LTC-IC** (Long Term Culture-Initiating Cell), qui permet de quantifier la fréquence des CSH dans une suspension cellulaire après plusieurs semaines de culture sur une couche de cellules stromales irradiées (Miller and Eaves 2002).

La cytométrie en flux permet de détecter les progéniteurs hématopoïétiques précoces peu différenciés en se basant sur l'expression de marqueurs membranaires. Dans la hiérarchie de la lignée hématopoïétique chez la souris, les cellules **Lin<sup>-</sup> Sca<sup>+</sup> Kit<sup>+</sup> CD150<sup>+</sup>** (*LSK CD150<sup>+</sup>* pour les anglophones ou *KLS CD150<sup>+</sup>* pour les francophones) sont des progéniteurs très peu différenciés, à l'état proche des cellules souches hématopoïétiques. Les cellules **Lin<sup>-</sup> Sca<sup>+</sup> Kit<sup>+</sup>** ayant perdu le marqueur membranaire CD150 (aussi appelé SLAM) sont encore relativement primitives, mais moins que les *KLS CD150<sup>+</sup>*.

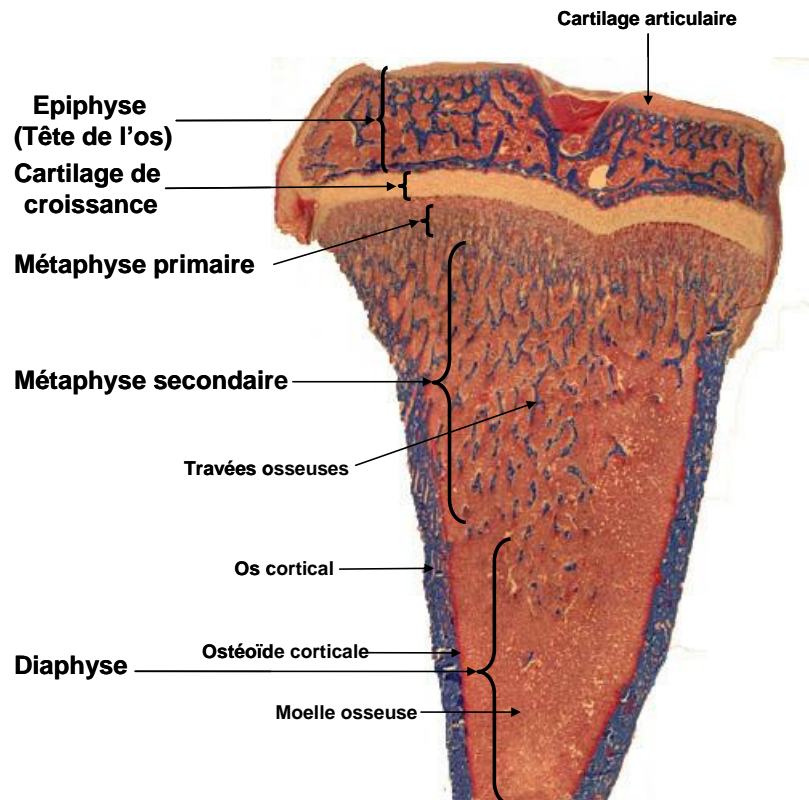
Le compartiment des progéniteurs clonogéniques peut quant à lui être investigué par des **tests clonogéniques quantitatifs en culture semi-solide**. Les milieux semi-solides, à base de méthylcellulose ou de collagène, contiennent différents facteurs de croissance stimulant la prolifération et la différenciation des PH de type CFC (Colony Forming Cells). Grâce à ce système *in vitro*, il est possible d'identifier les colonies issues de progéniteurs primitifs communs myéloïdes (CFU-GEMM), ainsi que les colonies issues de progéniteurs plus engagés vers les voies mégacaryocytaire (CFU-Mk), myélomonocytaire (CFU-GM, CFU-G et CFU-M) ou érythrocytaire (BFU-E, Burst Forming Unit) (O'Brien and Horton 1984).

## 2. Classification des tissus osseux

Les 213 pièces osseuses composant le squelette humain se classent selon des critères anatomiques et géométriques en trois catégories : les os longs (fémur, tibia, péroné), les os courts (vertèbres, carpes et tarses) et les os plats (sternum, omoplate, os du crâne) (Clarke 2008).

## 3. Anatomie des os longs

Les os longs sont constitués de plusieurs parties. La partie centrale de l'os se nomme la diaphyse. Il s'agit d'une cavité creuse renfermant de la moelle (osseuse et jaune). Aux deux extrémités se trouvent les épiphyses, recouvertes de cartilage articulaire. Au niveau de l'épiphyse se trouve le cartilage de conjugaison ou plaque épiphysaire de croissance, responsable de la croissance en longueur de l'os. La jonction entre l'épiphyse et la diaphyse est appelée métaphyse. La partie médullaire de la métaphyse renferme la moelle osseuse hématopoïétique.



**Photographie II-1 : Coupe histologique d'un tibia de rat.**  
(Donnée personnelle, coloration au Trichrome de Masson)

#### 4. Structure des os longs

Les différentes organisations des fibres de collagène de la matrice extracellulaire confèrent aux os longs des porosités et des microarchitectures variées qu'il convient de distinguer.

##### a) Os réticulaire ou fibreux ou os non lamellaire

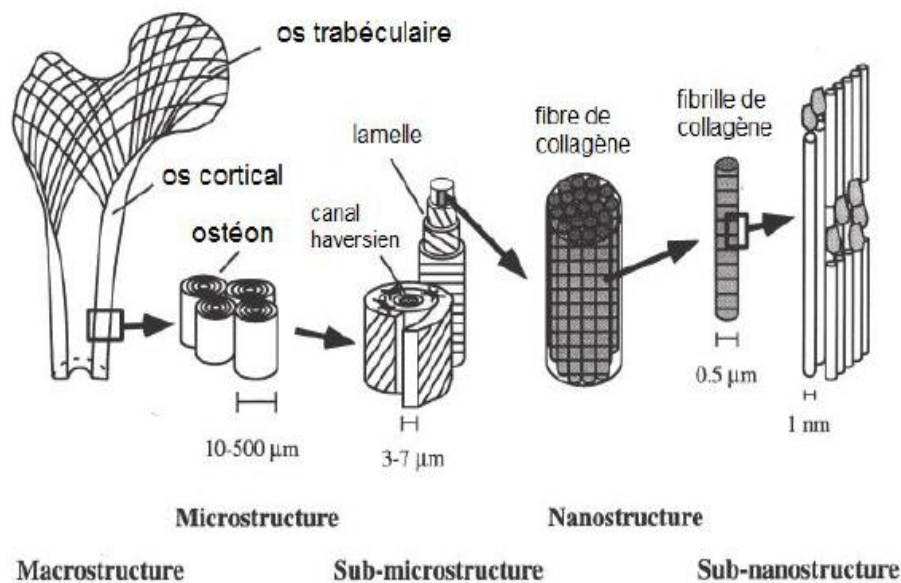
Il s'agit d'un os à la faible résistance mécanique du fait de la disposition irrégulière des fibres de collagène. Il est caractéristique de l'os embryonnaire. Chez l'adulte, on le retrouve notamment dans les phases précoces de la réparation osseuse, où il est rapidement remplacé par de l'os lamellaire.

##### b) Os lamellaire

Il tient son nom de l'assemblage parallèle des fibres de collagène qui forment des lamelles d'os superposées. Cette organisation spatiale stricte lui confère une haute résistance aux contraintes mécaniques. Deux variétés d'os lamellaire sont à différencier.

### **(1) Os cortical ou compact**

C'est un os dense et poreux qui constitue la diaphyse des os longs. Chez l'homme, les lamelles osseuses forment des ensembles circulaires nommés ostéons ou système de Havers de 200 à 300  $\mu\text{m}$  de diamètre. Chaque ostéon est centré par un canal de 50  $\mu\text{m}$  de diamètre, le canal de Havers, au sein duquel circulent des capillaires sanguins et des fibres nerveuses amyéliniques. Les canaux de Havers sont reliés entre eux par des canaux transversaux dits canaux de Volkmann dans lesquels cheminent les vaisseaux nourriciers de l'os. Tissu riche en ostéocytes, l'os cortical est spécialisé dans la réception des stimuli mécaniques et de la transmission de ces informations vers l'os trabéculaire. Sa densité en fait un réservoir important de calcium mais comme il ne représente que 20% des surfaces accessibles aux échanges, il est peu actif d'un point de vue métabolique. Deux membranes de tissu conjonctif sont associées à l'os cortical : le périoste, qui recouvre sa face externe, et l'endoste qui constitue une couche de tissu conjonctif tapissant la face interne de la corticale.



**Figure II-2 : Organisation structurale du tissu osseux compact**

### **(2) Os spongieux ou trabéculaire**

L'os spongieux se retrouve principalement dans l'épiphyse et la métaphyse des os longs où les charges mécaniques sont importantes. Il est composé d'un réseau tridimensionnel de lamelles osseuses reliées entre elles, les travées, qui donnent à l'os une apparence

d'éponge. Disposées dans le même sens que les forces de pression et de traction s'exerçant sur l'os, les travées sont responsables de la flexibilité et de la rigidité de l'os spongieux. Entre les travées circule la moelle osseuse hématopoïétique. Du fait de son architecture en maillage, le réseau trabéculaire permet une surface d'échange importante avec les micro-environnements médullaires et les cellules de la moelle. L'os trabéculaire est hautement actif d'un point de vue métabolique et constitue la cible principale du remodelage osseux.

On admet que les vertèbres sont constituées pour moitié d'os trabéculaire et pour moitié d'os cortical. Cette proportion passe à 30% d'os trabéculaire et 70% d'os cortical au niveau du col du fémur.

## 5. Composition de l'os

Le tissu osseux est un **tissu conjonctif** spécialisé constitué de **différents types cellulaires** et d'une **matrice extracellulaire**. Cette dernière comprend deux parties : une phase minérale inorganique en liaison étroite avec la matrice organique.

### a) Éléments cellulaires

Les cellules osseuses, qui trouvent leur origine dans la moelle, dérivent de deux grands groupes de cellules souches ostéocompétentes multipotentes :

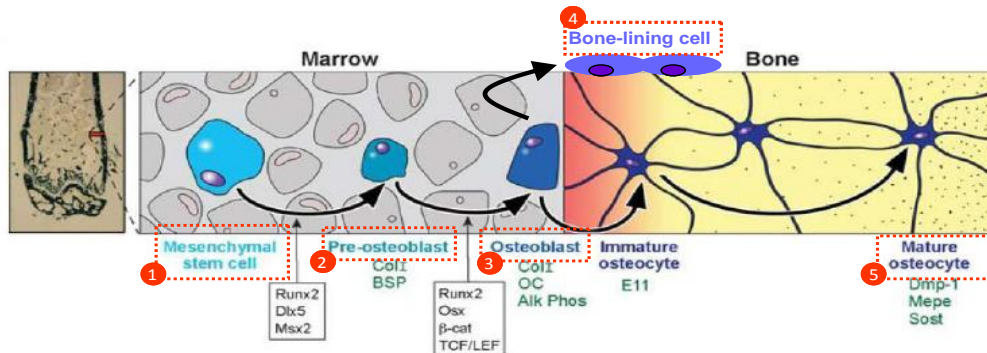
- Le groupe des **cellules souches /progéniteurs mésenchymateux ou stromales** (CSM), qui génère les cellules de la **lignée ostéoblastique**, ainsi que les chondrocytes et les adipocytes.
- Le groupe des **cellules souches hématopoïétiques** (CSH), qui donne naissance aux cellules sanguines et immunitaires, parmi lesquelles les monocyte-macrophages à l'origine de la lignée **ostéoclastique**.

#### ***(1) Lignée ostéoblastique***

Comme schématisé sur la figure II-3, la lignée ostéoblastique est composée des cinq principaux types cellulaires suivants (Aubin 1998; Long 2012) :

- 1) les cellules souches mésenchymateuses ou stromales
- 2) les pré-ostéoblastes

- 3) les ostéoblastes matures
- 4) les cellules bordantes
- 5) les ostéocytes



**Figure II-3 : Cellules de la lignée ostéoblastique**

En fonction de leur stade de développement, les cellules de la lignée expriment des marqueurs différents (quelques-uns de ces marqueurs sont figurés en vert, sous le nom des cellules). En encadré sont représentés des facteurs de transcription et des protéines régulant la transition d’une étape à l’autre (Robling, Castillo et al. 2006).

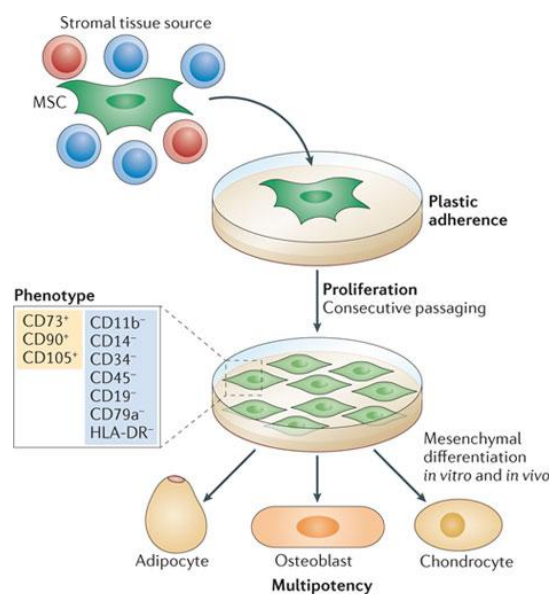
Abréviations: Col I: collagène de type I, BSP: Bone SialoProtein, OC: Osteocalcin, Alk Phos: Alkaline Phosphatase, Dmp-1: Dentin matrix protein-1, Mepe: Matrix extracellular phosphoglycoprotein, Sost: sclerostin.

**(a) Les cellules souches/progéniteurs mésenchymateux (CSM)**

Alexander Friedenstein, chercheur soviétique, a été le premier à observer que la moelle osseuse renferme des populations de cellules capables de générer *in vitro* des colonies d’aspect fibroblastique et adhérentes au plastique (CFU-F, Colony-Forming Unit Fibroblast). En montrant que chaque colonie, ensemencée individuellement sous la capsule rénale d’un rongeur, génère quelques semaines après du tissu fibreux et de l’os, il procure la preuve de l’existence d’un précurseur clonogénique pour les cellules ostéogéniques (Friedenstein, Chailakhjan et al. 1970). Par la suite, la mise en évidence des capacités de différenciation ostéoblastique, chondrocytaire et adipocytaire de cette population adhérente, ainsi que son aptitude à l’autorenouvellement, ont amené Caplan à proposer le terme de **cellule souche mésenchymateuse** en 1991. Dans les années 2000, des cellules au phénotype très proche des CSM de moelle osseuse ont été détectées dans un grand nombre de tissus adultes et foetaux, tels que le tissu adipeux, le foie, les reins ou encore le placenta... (da Silva Meirelles, Chagastelles et al. 2006). Depuis 2006, la Société Internationale de Thérapie Cellulaire (ISCT)

préconise l'utilisation du terme **cellule stromale mésenchymateuse (CSM)** pour désigner toute population de cellules remplissant les trois critères suivants, résumés sur le schéma II-4 :

- l'adhérence au plastique de culture
- un phénotype membranaire commun, déterminé par cytométrie en flux : chez l'homme, CD73<sup>+</sup>, CD90<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD11b<sup>-</sup>, CD14<sup>-</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD19<sup>-</sup>, CD79α<sup>-</sup>, HLA-DR<sup>-</sup>
- la multipotence vers les voies adipocytaire, ostéoblastique et chondrocytaire.

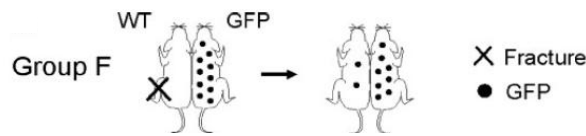


**Figure II-4 : Critères de définition d'une cellule stromale mésenchymateuse humaine**  
(Le Blanc and Mougiakakos 2012)

Si la présence de CSM et d'ostéoprogéniteurs précoces est bien établie dans la moelle osseuse, l'existence de telles populations dans la circulation sanguine est longtemps restée controversée. Des expériences d'infusion systémique montrent que les CSM ont une capacité limitée à traverser la barrière endothéliale et à se nicher dans les tissus squelettiques non lésés (Bentzon, Stenderup et al. 2005), suggérant que ces cellules sont non circulantes (Bianco, Robey et al. 2008). D'autres groupes indiquent, au contraire, que les CSM peuvent être recrutées dans la circulation sanguine en réponse à un stimulus mobilisateur. Ainsi, Rochefort montre qu'un épisode d'hypoxie hypobare de trois semaines chez le rat entraîne la mobilisation de CSM de la moelle vers le sang (Rochefort, Bruno et al.



2006). En 2008, Kumagai utilise un modèle de parabiose (figure II-5) pour montrer que des cellules progénitrices à potentiel ostéoblastique sont recrutées et véhiculées par voie systémique jusqu'au site de fracture, et qu'elles contribuent aux phases précoces de la réparation.



**Figure II-5 : Expérience de parabiose réalisée par Kumagai.**

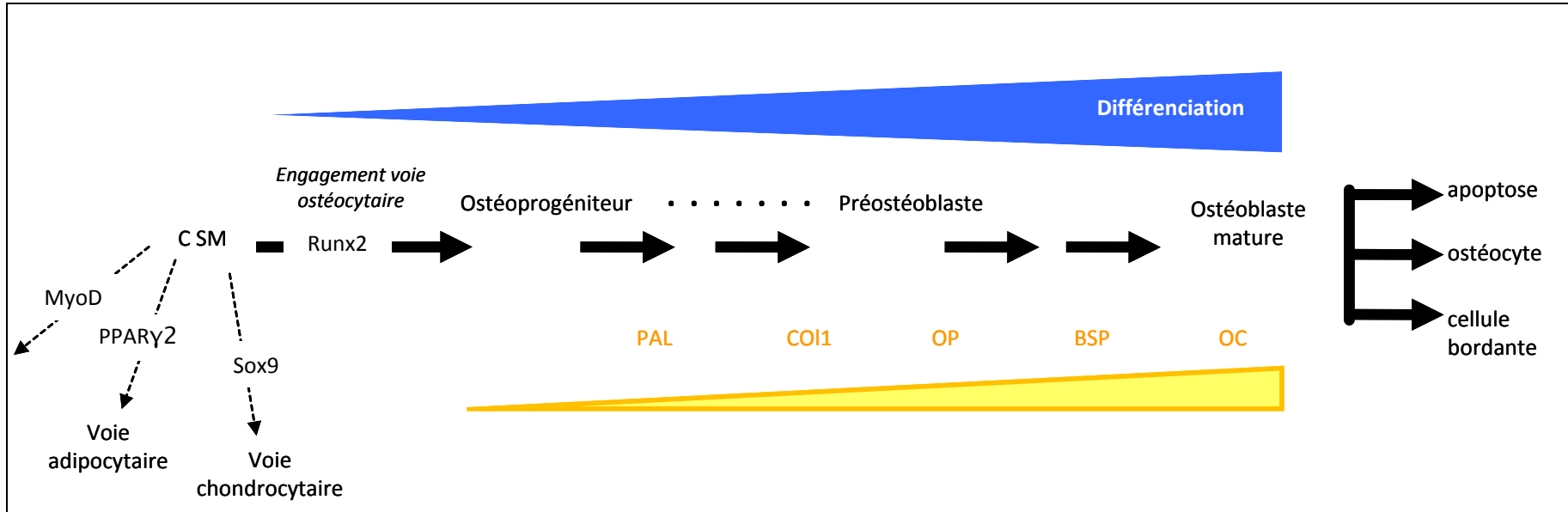
Dans ce schéma expérimental, deux souris, l'une de phénotype wild-type (WT), l'autre surexprimant la green fluorescence protein (GFP), sont reliées chirurgicalement, de façon à créer une paire conjointe de souris. Une semaine après la réalisation d'une fracture tibiale chez le partenaire wild-type, des cellules double positives pour la GFP et pour la phosphatase alcaline (marqueur de la lignée ostéoblastique) en provenance du partenaire GFP ont été localisées au niveau du cal fracturaire (Kumagai, Vasanji et al. 2008).

Des études ultérieures sont venues confirmer l'existence de ces cellules progénitrices circulantes à potentiel ostéoblastique, qui ont été nommées COP (cellules ostéoprogénitrices circulantes) (Pignolo and Kassem 2011). Le phénotype de ces cellules est matière à débat. Il pourrait être question de cellules adhérentes au plastique possédant un phénotype proche des CSM (Kuznetsov, Mankani et al. 2001; Otsuru, Tamai et al. 2008). D'autres études (Long, Robinson et al. 1995; Eghbali-Fatourehchi, Modder et al. 2007) rapportent qu'il s'agit plutôt de cellules non adhérentes exprimant à la fois des marqueurs ostéoblastiques (ostéocalcine, alcaline phosphatase notamment) et hématopoïétiques (dont le CD34 chez l'homme).

#### **(b) Différenciation préférentielle des CSM vers la voie ostéoblastique**

Les CSM ont la capacité de se différencier *in vivo* en chondrocytes, ostéoblastes, adipocytes ou myocytes. La différenciation préférentielle vers l'une ou l'autre voie implique l'expression temporelle de facteurs de transcription spécifiques. Ainsi, l'expression de MyoD induit la voie myoblastique, celle du peroxisome PPAR $\gamma$ 2 (Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ ) la voie adipocytaire, tandis que l'expression de Sox9 est reliée à la différenciation chondrocytaire. L'ostéogenèse, c'est-à-dire l'engagement et la différenciation des CSM vers

la voie ostéoblastique, requiert plus spécifiquement l'expression du facteur de transcription Runx2 (Runt-related transcription factor 2) aussi appelé Cbfa1 (Core binding factor  $\alpha$  1 protein) (figure II-6).



**Figure II-6 : Voie de la différenciation ostéoblastique.**

L'engagement des CSM vers l'ostéogenèse implique l'expression du facteur de transcription Runx2 et l'inhibition des facteurs MyoD, PPARγ2 et Sox9. Les cellules engagées acquièrent progressivement des protéines associées au phénotype ostéoblastique (figurées en jaune/orange). La PAL (Phosphatase Alcaline, le coll (Collagène I) et l'ostéopontine (OP) apparaissent aux stades précoces, tandis que la Bone SialoProtéine (BSP) et l'ostéocalcine (OC) sont spécifiques des ostéoblastes matures.

L'ostéoprogéniteur se différencie progressivement en **pré-ostéoblaste**. Ce dernier se différencie en ostéoblaste immature puis **ostéoblaste fonctionnel** chargé de la synthèse et de la minéralisation de la matrice. En fin de cycle, 50 à 70 % des ostéoblastes matures subissent l'apoptose, tandis que 10 à 30 % peuvent s'incorporer dans la matrice ostéoïde où ils deviennent **ostéocytes**. Le pourcentage d'ostéoblastes restant se transforme en **cellules bordantes**. (Long 2012).

Le contrôle de la différenciation et de l'activité des cellules de la lignée ostéoblastique est un mécanisme complexe, nécessitant des modifications intracellulaires d'expression de facteurs de transcription et impliquant des voies de signalisation paracrines et endocrines.

Les effets de ces principaux facteurs sont récapitulés dans le tableau II-1 ci-dessous.

Facteurs de transcription	Effets sur la voie de différenciation ostéoblastique	Références
<b>Runx2 (Cbfa1)</b>	Essentiel à la détermination des CSM vers la lignée ostéoblastique. Augmente l'expression des gènes de protéines de la matrice pendant la différenciation. L'expression de runx2 est diminuée dans les phases de maturation des ostéoblastes.	(Ducy 2000; Komori 2010)
<b>Dlx5 et Msx2</b>	Agissent en amont de runx2 dont ils modulent l'expression. Régulent positivement l'engagement vers la différenciation des pré-ostéoblastes.	(Satokata, Ma et al. 2000; Lee, Kwon et al. 2003)
<b>Twist</b>	Action anti-ostéogénique. Inhibe la prolifération et la différenciation ostéoblastiques.	(Yousfi, Lasmoles et al. 2001)
<b>Osterix</b>	Agit en aval de runx2, favorise la différenciation ostéoblastique et active le gène de l'ostéocalcine.	(Nakashima, Zhou et al. 2002)

Molécules/voies de signalisation	Effets sur la voie de différenciation ostéoblastique	Références
<b>Voie Wnt/<math>\beta</math>caténine</b>	Favorise la voie ostéogénique en induisant la prolifération et la différenciation ostéoblastiques. Anti-apoptotique.	(Galli, Passeri et al. 2010)
<b>IGF</b>	Stimule la différenciation ostéoblastique en augmentant la transcription de collagène de type I et d'ostéocalcine.	(Ogata, Chikazu et al. 2000)
<b>Superfamille des TGF-<math>\beta</math>, dont les BMPs</b>	Stimule la prolifération et la différenciation ostéoblastiques, en augmentant Dlx5 qui induit Runx2. Stimule l'expression de la phosphatase alcaline, du collagène de type I et de l'ostéocalcine. Anti-apoptotique.	(Mundy, Garrett et al. 1999; Sowa, Kaji et al. 2002)
<b>FGF</b>	Augmente la prolifération cellulaire ostéoblastique, stimule la synthèse de phosphatase alcaline et d'ostéocalcine.	(Canalis, Centrella et al. 1988)
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Action anti-ostéogénique, réduit la différenciation ostéoblastique en favorisant la dégradation de runx2 par le protéasome.	(Kaneki, Guo et al. 2006)
<b>Ihh</b>	Rôle important dans l'initiation de la voie ostéoblastique et les stades précoces de la différenciation.	(Nakamura, Aikawa et al. 1997)

**Tableau II-1 : Principaux facteurs impliqués dans la régulation de la différenciation ostéoblastique.** Abréviations: Runx2 : Runt-related transcription factor 2, Msx2 : msh homeobox homolog-2, Dlx5 : Distal-less homeobox-5, IGF : Insulin-like growth factors, TGF- $\beta$  : Transforming Growth Factor bêta FGF : Fibroblast Growth Factors, TNF- $\alpha$  : Tumor necrosis factor alpha, Ihh : Indian Hedgehog.

### (c) Pré-ostéoblastes

Le pré-ostéoblaste est une cellule de petite taille (10 à 20µm), à la morphologie et à l'ultrastructure proches de l'ostéoblaste, dont il est le précurseur immédiat (Aubin, Principles of Bone Biology, chapter 5). La cellule exprime un certain nombre de gènes ostéoblastiques précoces, dont la **phosphatase alcaline**, le **collagène de type 1**, le **PTHr1** (Type 1 Parathyroid Receptor) et l'**ostéopontine**, mais n'a pas encore acquis les différents marqueurs de l'ostéoblaste différencié (Bellows, Reimers et al. 1999). Contrairement aux ostéoblastes matures, les pré-ostéoblastes possèdent un pouvoir prolifératif *in vivo* (Owen and Macpherson 1963).

### (d) Ostéoblastes

L'induction de gènes ostéoblastiques tardifs (codant la Bone Sialoprotéine et l'ostéocalcine notamment) participe à la différenciation des pré-ostéoblastes en ostéoblastes fonctionnels (Owen, Aronow et al. 1990; Nagata, Bellows et al. 1991). De forme rectangulaire cuboïdale, mesurant entre 20 et 30 µm de diamètre chez l'homme, les ostéoblastes sont disposés en rangées, à la surface du tissu ostéoïde qu'ils élaborent. Il s'agit de cellules en phase post-proliférative, dont l'intense activité de synthèse protéique se traduit, au niveau ultrastructurel, par la présence d'organites intracellulaires volumineux et bien développés (Kassem, Rungby et al. 1992) Les deux grandes fonctions de l'ostéoblaste sont la **synthèse de la matrice extracellulaire** et la participation à sa **minéralisation**. A cet effet, les ostéoblastes synthétisent un grand nombre de protéines matricielles (**collagène de type I, fibronectine, ostéopontine, ostéonectine, ostéocalcine, BSP**), et leur membrane cytoplasmique est dotée de bourgeonnements particuliers, les vésicules matricielles, spécialisées dans le dépôt de la matrice (Anderson, Sipe et al. 2004; Neve, Corrado et al. 2011). Les ostéoblastes synthétisent aussi des **protéoglycanes**, dont certains (biglycane, décorine) sont inclus dans la matrice (Gehron Robey 1989). Ils produisent également des **collagénases**, ce qui leur permet de participer au contrôle de la dégradation de la matrice (Holmbeck, Bianco et al. 1999). Par ailleurs, la sécrétion de facteurs solubles (**RANK-L, OPG**) et de cytokines (**IL-1, IL-6**) confère à l'ostéoblaste des propriétés importantes dans la régulation des cellules du microenvironnement médullaire (Suda, Takahashi et al. 1999). Il joue un rôle particulièrement important dans le contrôle de l'ostéoclastogenèse (cf paragraphe II-A-2-b).

Très récemment, l'équipe de Schipani a montré que l'expression de la voie HIF (Hypoxia-Inducible Factor) dans les ostéoblastes entraîne la production d'**érythropoïétine** (Epo) par ces derniers, menant à une augmentation locale et systémique du taux d'Epo ainsi qu'à une stimulation de l'érythropoïèse médullaire et splénique (Rankin, Wu et al. 2012).

A l'issue des phases de synthèse et de minéralisation de la matrice extracellulaire, le niveau d'expression de l'ARNm de la phosphatase alcaline diminue (Lian and Stein 1995). A ce stade, les ostéoblastes ont trois devenir possibles : l'apoptose, la transformation en ostéocytes ou celle en cellules bordantes (Franz-Odenaal, Hall et al. 2006).

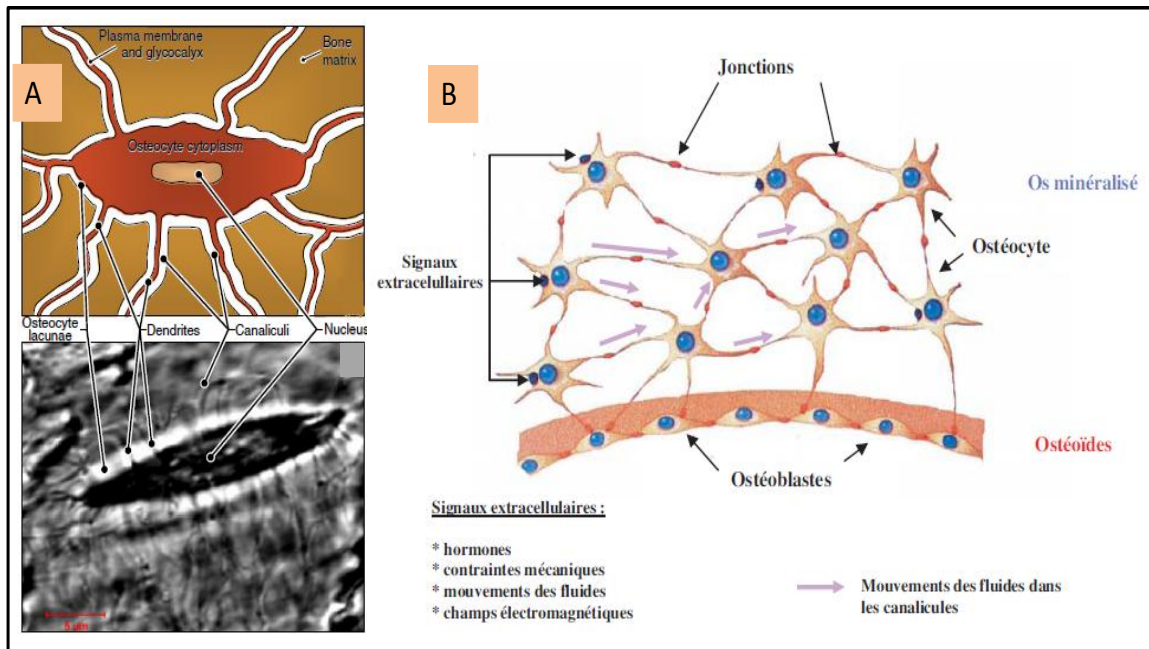
#### **(e) Cellules bordantes**

Aussi appelés ostéoblastes inactifs, ou bone lining cells en anglais, il s'agit d'ostéoblastes qui se sont progressivement aplatis et qui forment une couche cellulaire le long des surfaces osseuses inactives (c'est-à-dire ne subissant ni ostéogenèse, ni ostéoclasie). Le noyau des cellules bordantes est ovoïde et plat, le cytoplasme est pauvre en organites. L'ostéoïde est peu présente sous les cellules bordantes. Elles sont unies entre elles et aux ostéocytes par des systèmes de jonctions communicantes (Miller, de Saint-Georges et al. 1989). Un rôle de barrière fonctionnelle entre l'os calcifié et les cellules de la moelle a été attribué aux cellules bordantes, et leur importance a notamment été démontrée dans les phases d'initiation du remodelage osseux (cf paragraphe II-B-1-b). Elles permettraient de délimiter le compartiment de remodelage, et agiraient en amont des ostéoclastes pour préparer l'activité de dégradation de la matrice. Dobnig et Turner ont par ailleurs montré que les cellules bordantes sont capables de se différencier en ostéoblastes actifs, sous l'action de certains stimuli comme la PTH (Dobnig and Turner 1995). Elles pourraient donc constituer une source de cellules ostéoblastiques de réserve pour l'os, mais leurs rôles précis dans la physiologie osseuse sont toujours sujet à débat.

#### **(f) Ostéocytes**

Dérivant d'une différenciation terminale des ostéoblastes, les ostéocytes sont des cellules emmurées dans la matrice minéralisée au sein de logettes appelées ostéoplastes. Il s'agit du type cellulaire le plus abondant du tissu osseux, puisqu'il représente 95 % de l'ensemble des

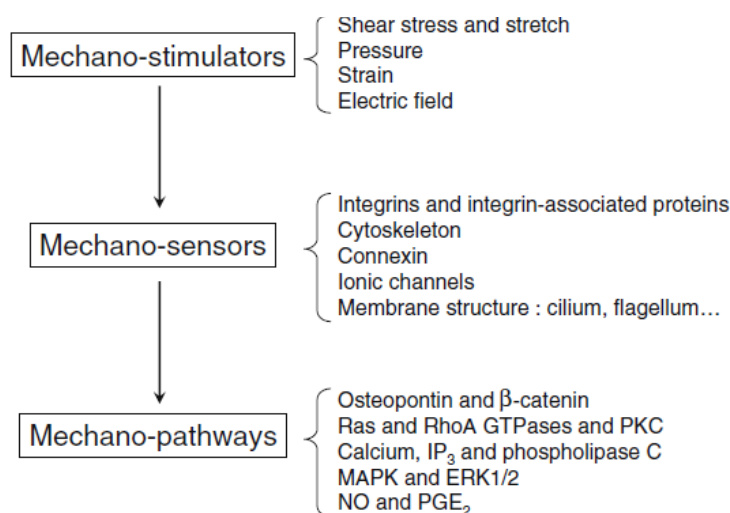
cellules de l'os de mammifère (Bonewald 2006). La densité des ostéocytes dans l'os humain est estimée entre 20 000 et 80 000 cellules par  $\text{mm}^3$ , et monte jusqu'à 93 000 cellules par  $\text{mm}^3$  d'os chez la souris (Mullender, Huiskes et al. 1996). Chez l'homme, la demi-vie de ces cellules est évaluée à 25 ans (Frost 1987). Le corps cellulaire des ostéocytes est fusiforme, avec un noyau condensé et central. La cellule présente de nombreuses extensions cytoplasmiques appelées dendrites, qui cheminent au-delà de l'ostéoplaste à travers un réseau de canalicules creusés dans la matrice et baignés de liquide extra-cellulaire (figure II-7). Ce réseau canaliculaire permet de relier les ostéocytes entre eux et aux cellules situées à la surface de l'os, notamment les ostéoblastes et les cellules bordantes. La transmission d'informations entre ostéocytes est réalisée par le biais de jonctions communicantes intercellulaires (Civitelli 2008). Le rôle des ostéocytes dans la physiologie osseuse est longtemps resté méconnu (Bonewald 2011). Plusieurs études ont montré que ces cellules semblent participer à la transmission des informations concernant les contraintes appliquées à l'os, faisant des ostéocytes de bons candidats au rôle de mécano-transducteur de l'os.



**Figure II-7 : Réseau ostéocytaire.**

En A), représentation schématique (haut) et image en microscopie confocale (bas) d'un ostéocyte de rat Wistar (Rocheftort, Pallu et al. 2010). En B), schéma illustrant le réseau canaliculaire et son importance dans la mécano-transduction ostéocytaire.

Lors d'une contrainte, le tissu osseux subit des déformations locales. Les gradients de pression que le tissu provoque en se déformant génèrent des mouvements de liquide extracellulaire à travers le réseau canaliculaire. Ces mouvements sont détectés par les ostéocytes qui, en réponse, émettent des signaux de nature biochimique vers les cellules de la surface osseuse (Bonewald 2006) (figure II-8).

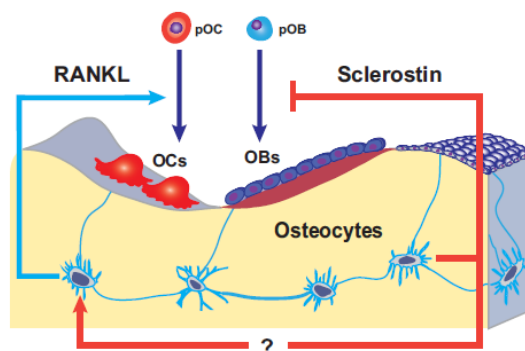


**Figure II-8 : Etapes de la mécano-transduction ostéocytaire**  
(Rocheffort, Pallu et al. 2010).

Les propriétés mécano-sensitives des ostéocytes leur confèrent un rôle primordial dans l'initiation du cycle de remodelage. Cette fonction sera abordée plus en détail dans le chapitre II-B-1-b, relatif au remodelage osseux.

En plus de ce rôle initiateur, des études récentes montrent que les ostéocytes participent également à la régulation du couplage entre formation et résorption au cours du remodelage via la sécrétion de la protéine RANKL (Nakashima, Hayashi et al. 2011) et de la sclérostine (Robling, Niziolek et al. 2008). Nakashima a montré que les ostéocytes synthétisent RANKL qui, en se liant au récepteur RANK localisé sur la membrane des précurseurs des ostéoclastes, favorise la différenciation ostéoclastique (Nakashima, Hayashi et al. 2011). La sclérostine est quant à elle un puissant inhibiteur de la formation osseuse synthétisée spécifiquement par les ostéocytes. Son mode d'action passe par le blocage de la voie de signalisation ostéogénique Wnt/ $\beta$ -caténine dans les précurseurs ostéoblastiques (Li, Zhang et al. 2005). La modulation de la formation osseuse par les ostéocytes semble jouer un rôle clé au cours du remodelage osseux (Tatsumi, Ishii et al. 2007; Moester, Papapoulos et al. 2010). Les mécanismes précis de la régulation restent toutefois à élucider.





**Figure II-9 : Contrôle indépendant de la formation et la résorption osseuses par les ostéocytes.**

Les ostéoclastes (Oc) et les ostéoblastes (Ob) sont montrés au sein d'une unité de remodelage, dérivant de leurs progéniteurs respectifs (pOc et pOb). Les ostéocytes synthétisent la molécule pro-ostéoclastique RANKL. Ils sont aussi source de sclérostine, un puissant inhibiteur de l'activité des ostéoblastes.

## **(2) Lignée Ostéoclastique**

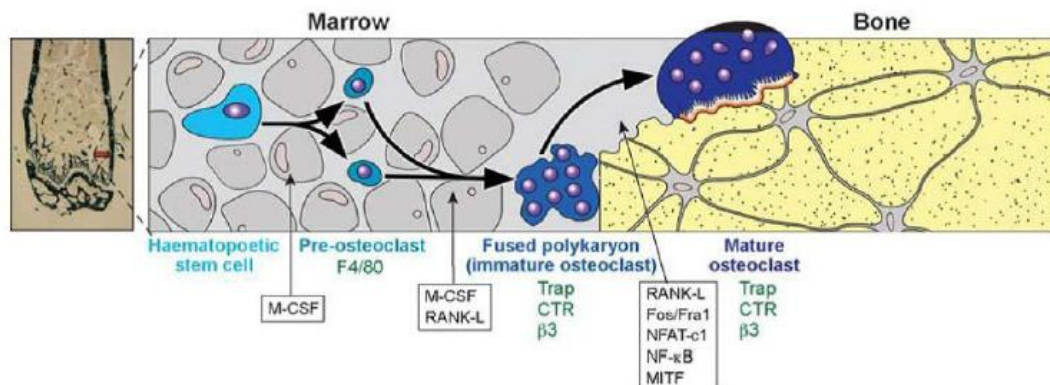
### **(a) Cellules Souches Hématopoïétiques (CSH)**

Isolées en 1961 par Till et Mc Culloch, les cellules souches hématopoïétiques (CSH) sont des cellules souches adultes multipotentes capables de reconstituer l'ensemble de l'hématopoïèse lorsqu'elles sont transplantées dans un animal létalement irradié (Till and Culloch 1961). Elles sont douées d'auto-renouvellement, c'est-à-dire qu'elles ont la capacité de se diviser en donnant naissance à une cellule fille identique à la cellule mère. Les CSH représentent environ 0,005 % à 0.01 % des cellules totales de la moelle osseuse (Sutherland, Lansdorp et al. 1990). Chez la souris, deux populations de cellules souches hématopoïétiques ont été identifiées, d'après leur capacité à reconstituer une hématopoïèse normale après injection à des animaux irradiés ou conditionnés via des traitements myélosuppresseifs. Les deux populations injectées ont l'aptitude de repeupler la moelle du receveur mais avec des potentiels de greffe différents. Le plus grand potentiel est observé pour la population la plus primitive et la plus rare, appelée *Long-Term Repopulating Cells (LT-RC)* (présente à la fréquence de 1/10000). Comme son nom l'indique, la population LT-RC permet une reconstitution à long terme de l'hématopoïèse, au-delà de 10 semaines, et greffe à nouveau lorsqu'elle est injectée dans un hôte secondaire. La population des *Short-Term Repopulating*

*Cells (ST-RC)*, qui dérive des LT-RC (fréquence : 1/2000), présente un potentiel d'auto-renouvellement plus limité, et donc un potentiel de greffe plus bref.

### (b) Différenciation ostéoclastique

Comme indiqué sur la figure II-10, l'ostéoclaste est une cellule d'origine hématopoïétique. Les précurseurs de l'ostéoclaste sont issus des lignées myéloïdes (CFU-GM), et dérivent de la fusion des pro-monocytes (Suda, Takahashi et al. 1999). Les précurseurs monocytaires peuvent se différencier en monocytes/macrophages, en cellules dendritiques ou en ostéoclastes en fonction des facteurs présents dans leur environnement.

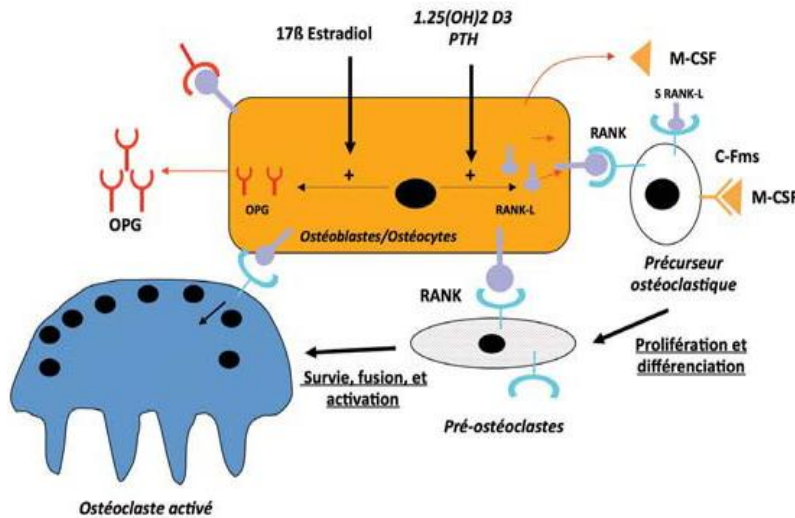


**Figure II-10 : Cellules de la lignée ostéoclastique.**

Les ostéoclastes ont une origine commune avec les monocytes/macrophages de la moelle osseuse. La différenciation des promonocytes en ostéoclastes se fait sous l'influence de facteurs de transcription (PU-1, c-fos, NFκB, NFATc1, Mitf, Myc) et de facteurs de croissance (M-CSF, RANK-L), dont certains sont figurés sur le schéma. La fusion asynchrone des précurseurs entraîne la formation d'une cellule multinucléée qui subit sa maturation finale au contact de la surface osseuse (figure d'après Robling, Castillo et al. 2006).

Abréviations: Macrophage-Colony Stimulating Factor (M-CSF), Receptor Activator of NFκB Ligand (RANK-L)

La spécification des pro-monocytes en ostéoclastes nécessite des interactions étroites avec les cellules mésenchymateuses et les ostéoblastes (Suda, Takahashi et al. 1999). Ces interactions font intervenir non seulement des molécules synthétisées par les cellules mésenchymateuses et actives sur les précurseurs ostéoclastiques, mais aussi des contacts directs entre les deux types cellulaires (Takahashi, Akatsu et al. 1988).



**Figure II-11: Rôle de la triade RANK/RANK-L/OPG dans la différenciation ostéoclastique.**

Les estrogènes augmentent la synthèse du récepteur leurre OPG, tandis que le métabolite actif de la vitamine D favorise la différenciation ostéoclastique en stimulant la production de RANK-L par les ostéoblastes (Desoutter, Mentaverri et al. 2012).

(Receptor Activator of Nuclear Factor  $\kappa$ B Ligand), synthétisé par les ostéoblastes et qui existe sous forme membranaire ou soluble. L'interaction RANK/RANK-L est nécessaire, et suffisante en présence du facteur de co-stimulation M-CSF (Macrophage-Colony Stimulating Factor), pour permettre la différenciation ostéoclastique (Troen 2003). Comme noté plus haut, des études récentes de Nakashima indiquent que les ostéocytes constituent une source majeure de RANKL dans le micro-environnement médullaire, et pourraient ainsi influencer l'ostéoclastogenèse de façon similaire aux ostéoblastes (Nakashima, Hayashi et al. 2011). La disponibilité de RANK-L dans le micro-environnement médullaire est modulée par les ostéoblastes eux-mêmes, *via* la sécrétion d'un récepteur leurre, l'ostéoprotégérine (OPG). En se fixant sur le RANK-L, l'OPG soluble rend impossible l'interaction RANK/RANK-L et exerce donc un effet inhibiteur sur la différenciation ostéoclastique (figure II-11).

L'engagement dans la voie de différenciation ostéoclastique est à tout moment sous la dépendance du ratio RANK-L/OPG, et les principaux facteurs modulant la résorption osseuse (estrogènes, PTH,...) agissent essentiellement sur le niveau d'expression de l'un ou de l'autre.

Cette différenciation de pré-monocytes en précurseurs ostéoclastiques se déroule dans la moelle osseuse. La maturation finale des pré-ostéoclastes se déroule au contact de la

Parmi ces facteurs de différenciation, la triade moléculaire **RANK/RANK-L/OPG** joue un rôle fondamental. Les précurseurs mononucléés présents dans la moelle expriment à leur surface un facteur protéique transmembranaire de la famille des récepteurs au TNF : le RANK (Receptor Activator of Nuclear Factor  $\kappa$ B). Ce récepteur est capable de se lier au ligand RANK-L

surface osseuse, où les précurseurs adhèrent et fusionnent de façon asynchrone, de façon à former une cellule multinucléée, l'ostéoclaste mature.

### (c) Ostéoclastes

L'ostéoclaste mature est une cellule polynucléée de grande taille (100µm de diamètre chez l'homme en moyenne) spécialisée dans la résorption du tissu osseux (figure II-12). Son ultrastructure comportant de nombreuses mitochondries, vacuoles, lysosomes ainsi qu'un appareil de Golgi et un réticulum endoplasmique développés, traduit l'implication de la cellule dans la production énergétique et protéique (Baron 1999).

L'ostéoclaste en phase de résorption se caractérise par une bipolarité morphologique et fonctionnelle. En regard de la matrice osseuse se trouve le pôle apical, composé d'une bordure en brosse d'extensions cytoplasmiques, au contact de laquelle l'os est résorbé. La résorption débute par l'adhésion de l'ostéoclaste à la travée osseuse par la liaison de l'intégrine  $\alpha\beta3$  (récepteur de la vitronectine) à sa séquence consensus Arg-Gly-Asp (RGD) (Vaananen and Horton 1995). Ce motif tripeptidique est contenu dans certaines protéines matricielles dont le collagène de type I, l'ostéopontine et la BSP. Une poche hermétique se constitue alors entre la travée osseuse et la membrane plissée de façon à délimiter un compartiment de résorption. *Via* des pompes à protons de type vacuolaire, l'ostéoclaste libère des ions  $H^+$  qui acidifient le compartiment et permettent la dissolution de la matrice minérale (Blair, Teitelbaum et al. 1989). Cette acidification permet également de créer un microenvironnement propice à l'action d'enzymes protéolytiques chargées de la dégradation de la composante organique de la matrice. L'ostéoclaste sécrète des enzymes lysosomiales, dont la **TRAP** (Tartrate Resistance Acid Phosphatase – (Ek-Rylander, Flores et al. 1994)) et la protéinase **cathépsine K** (capable de digérer complètement le collagène I à pH acide - (Inaoka, Bilbe et al. 1995)), ainsi que des métalloprotéinases, telle que **MMP-9** (Matrix-Metallopeptidase 9 - (Reponen, Sahlberg et al. 1994)). L'os résorbé laisse peu à peu la place à une cavité irrégulière, la lacune de résorption aussi appelée lacune de Howship. Le pôle baso-latéral, en contact avec l'environnement médullaire, contient de nombreux récepteurs, transporteurs et canaux ioniques nécessaires à la fonction de la cellule et au maintien de son équilibre électrochimique pendant la résorption. Ainsi, le pôle basal est à la fois muni d'un excréteur de base (l'échangeur  $HCO_3^-/Cl^-$ ) et d'un excréteur d'acide (l'échangeur  $Na^+/H^+$ ). L'excréteur de base est nécessaire à l'acidification du cytoplasme (Teti, Blair et al. 1989),

tandis que l'activité de l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , qui consiste à éliminer les protons, est essentielle au maintien d'un pH physiologique à l'intérieur du cytoplasme de l'ostéoclaste (Ravesloot, Eisen et al. 1995). L'apex du pôle basolatéral est par ailleurs doté d'un domaine fonctionnel de sécrétion qui permet l'évacuation dans le milieu extracellulaire des produits de dégradation protéique transportés par transcytose à travers la cellule.

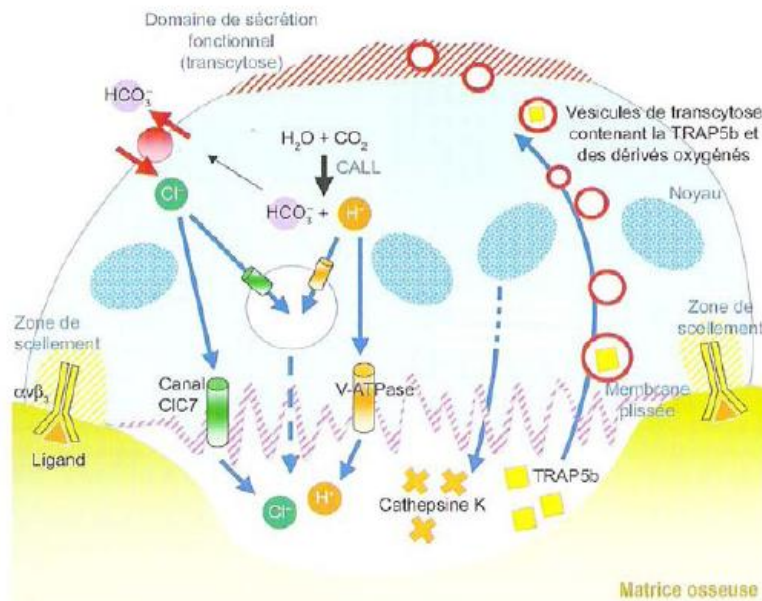


Figure II-12 : Schéma d'un ostéoclaste mature

## b) Matrice osseuse extracellulaire

La matrice osseuse extracellulaire est constituée de :

- 35% de matériel organique (principalement des fibres de collagène, des protéines osseuses et des protéoglycanes).
- 65 % de sels minéraux.

Ce sont les caractéristiques de la matrice extracellulaire qui confèrent à l'os ses propriétés mécaniques. Ainsi, la calcification de la matrice explique la grande résistance de l'os à la pression et à la traction. Sa résistance accrue à la torsion et la flexion est le fait de l'association ordonnée des fibrilles de collagène de la phase organique de la matrice.

### (1) Phase minérale inorganique

La fraction inorganique de la matrice désigne un dépôt de phosphate de calcium cristallisé sous la forme d'hydroxyapatite (HAP), de formule  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ . Les cristaux d'apatite, en

forme d'aiguilles, mesurent environ 40 nm de longueur et entre 1,5-3 nm d'épaisseur. La minéralisation de l'os désigne le dépôt des cristaux d'hydroxyapatite dans le réseau des fibres de collagène de la phase organique. Ce mécanisme est principalement dirigé par les ostéoblastes. Ces cellules développent un système de vésicules matricielles, petits bourgeonnements cytoplasmiques qui en se détachant libèrent leur contenu enrichi en apatite. La minéralisation fait également appel à des protéines de la phase organique, comme l'ostéocalcine, l'ostéonectine et l'ostéopontine qui jouent un rôle dans la naissance des cristaux d'apatite. Enfin, citons l'importance de la phase inorganique elle-même dans le processus de minéralisation, *via* l'intervention d'ions comme le citrate et le carbonate.

## ***(2) Phase organique***

La phase organique est à 90 % constituée de **collagène de type I** et à 10 % de PNC, **protéines non collagéniques**. Bien que minoritaires, ces dernières participent à l'organisation macromoléculaire du tissu osseux et interviennent dans de nombreux aspects de la physiologie osseuse comme les mécanismes de minéralisation ou la régulation du couplage formation/résorption au cours du remodelage. Les différentes familles protéiques de la phase organique de la matrice et leurs rôles respectifs sont récapitulés dans le tableau ci-dessous.

<b>Protéines collagéniques</b>			
<b>Collagène I</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Contribue aux propriétés mécaniques de la matrice osseuse.</li> <li>• Sa dégradation, au cours de la résorption, permet la libération de nombreuses protéines impliquées dans la régulation du métabolisme osseux.</li> </ul>	(Knott and Bailey 1998)	
<b>Collagènes III, V et X</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Impliqués dans la régulation du diamètre des fibrilles de collagène I et dans les mécanismes de minéralisation.</li> </ul>		
<b>Protéines non collagéniques (PNC)</b>			
<b>Protéines <math>\gamma</math>-carboxylées</b>	Ostéocalcine = Bone Gla Protein (BGP) = Gla Protéine osseuse	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Agit sur la formation osseuse en modulant l'activité des ostéoblastes.</li> <li>• Inhibiteur de la minéralisation osseuse.</li> </ul>	(Luo, Ducey et al. 1997) (Neve, Corrado et al. 2013)
	Gla Protéine Matricielle (GPM)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Inhibiteurs de la formation des cristaux d'hydroxyapatite.</li> </ul>	(Price, Urist et al. 1983)
	Protéine S		
<b>Glycoprotéines SIBLINGs (Small Integrin-Binding Ligand N-linked Glycoproteins)</b>	Ostéopontine	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Synthétisée par les ostéoblastes, les ostéoclastes et les ostéocytes.</li> <li>• Inhibiteur de la minéralisation.</li> <li>• Régulateur de l'activité des ostéoblastes et des ostéoclastes.</li> </ul>	(Kojima, Ueda et al. 2004) (Standal, Borset et al. 2004)
	Sialoprotéine osseuse = Bone Sialoprotein (BSP)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Activateur de la minéralisation du tissu osseux.</li> <li>• Régulateur de l'activité des ostéoblastes et des ostéoclastes.</li> </ul>	(Staines, MacRae et al. 2012), (Alford and Hankenson 2006)
<b>Glycoprotéines non SIBLINGs</b>	Phosphatase Alcaline osseuse (PAL)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Synthétisée par les ostéoblastes.</li> <li>• Rôle clé dans la minéralisation du tissu osseux.</li> </ul>	(Balcerzak, Hamade et al. 2003)
	Ostéonectine = Secreted Protein Acidic and Rich in Cystein (SPARC) = Basement Membrane protein of 40 kDa (BM-40)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Synthétisée par les ostéoblastes.</li> <li>• Inhibiteur de la formation des cristaux d'hydroxyapatite.</li> </ul>	(Nagata, Bellows et al. 1991; Alford and Hankenson 2006)
<b>Protéoglycanes</b>			
<b>Décorine</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Régulateurs de la mise en place et de la stabilité de la trame collagénique.</li> <li>• Impliqués dans la minéralisation du tissu osseux.</li> </ul>	(Weber, Harrison et al. 1996) (Markmann, Hausser et al. 2000)	
<b>Biglycane</b>			
<b>Protéines plasmatiques adsorbées</b>			
<b>Albumine</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Inhibiteur de la formation des cristaux d'hydroxyapatite</li> </ul>	(Garnett and Dieppe 1990)	
<b><math>\alpha 2</math> HS glycoprotéine</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Inhibiteur de la formation des cristaux d'hydroxyapatite</li> <li>• Stimulateur de l'adipogenèse</li> <li>• Antagoniste du TGF-<math>\beta</math></li> </ul>	(Schinke, Amendt et al. 1996) (Cayatte, Kumbula et al. 1990)	
<b>Facteurs de croissance</b>			
<b>BMPs, PDGF, IGF, TGF-<math>\beta</math>,...</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Rôles variés (cf chapitres suivants)</li> </ul>	(Solheim 1998)	

**Tableau II-2: Protéines de la phase organique de la matrice osseuse**

## **B. Le tissu osseux : un système dynamique**

### **1. Remodelage osseux**

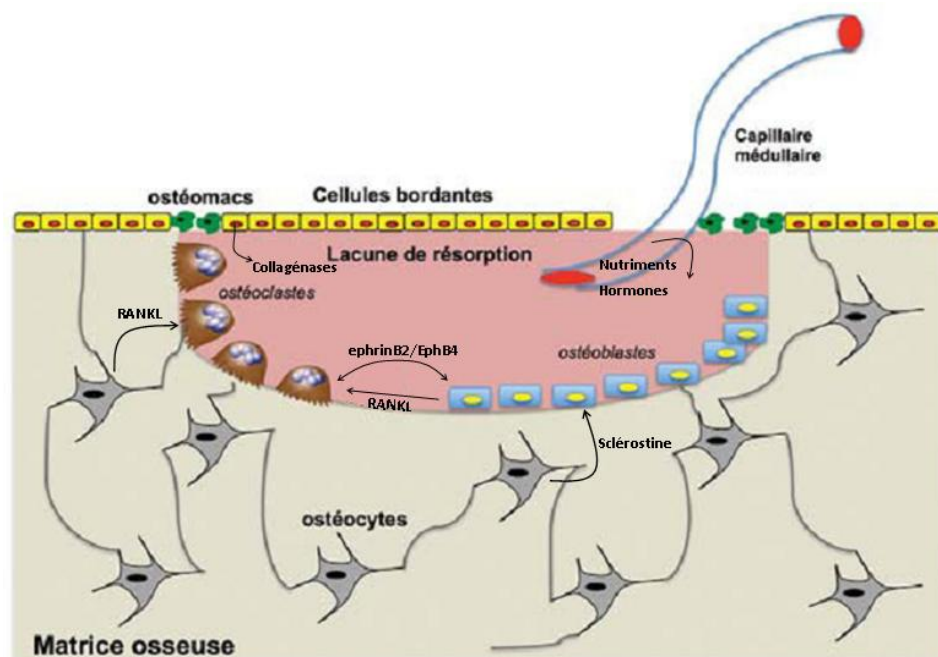
L'os est un tissu dynamique, dont le renouvellement constant est assuré par le mécanisme de remodelage. Ce mécanisme, qui se déroule à la surface des os cortical et trabéculaire, est nécessaire au maintien de l'homéostasie calcique, à l'adaptation du squelette aux contraintes mécaniques et à la consolidation des fractures (Seeman and Delmas 2006). Le processus de remodelage résulte de la résorption de la matrice osseuse par les ostéoclastes, suivie de la reformation de la matrice par les ostéoblastes. Dans les conditions physiologiques normales chez l'homme adulte, la taille du volume osseux néo-formé est équivalente à la taille du volume résorbé (Lips, Courpron et al. 1978). La succession coordonnée des activités ostéoclastique et ostéoblastique se déroule au sein d'unités de remodelage, les Basic Multicellular Unit (BMU).

#### **a) Les Basic Multicellular Unit (BMU) : unités fonctionnelles de remodelage**

Le remodelage se déroule grâce à l'action concertée de différents types cellulaires localisés au sein des BMU. Comme représenté sur la figure II-13, une BMU est constituée :

- d'ostéoclastes qui résorbent l'ancien tissu osseux
- d'ostéoblastes chargés de synthétiser la nouvelle matrice osseuse
- d'ostéocytes, emmurés dans la matrice, ils participent à la régulation du remodelage
- de cellules bordantes recouvrant la surface de l'os
- de cellules endothéliales et de vaisseaux sanguins, assurant l'apport de nutriments et d'hormones.
- D'OsteoMac (Osteal Macrophages), macrophages résidents spécifiques du tissu osseux, récemment mis en évidence (Chang, Raggatt et al. 2008).





**Figure II-13: Unité fonctionnelle de remodelage (BMU).**

Le compartiment de remodelage est constitué d'ostéoclastes, d'ostéoblastes, d'ostéocytes, de cellules bordantes et de cellules endothéliales qui coopèrent afin d'assurer le bon déroulement du processus. Chaque type cellulaire est à l'origine de facteurs modulateurs pouvant réguler les autres types cellulaires présents (seuls quelques facteurs modulateurs sont représentés ici) (Desoutter, Mentaverri et al. 2012).

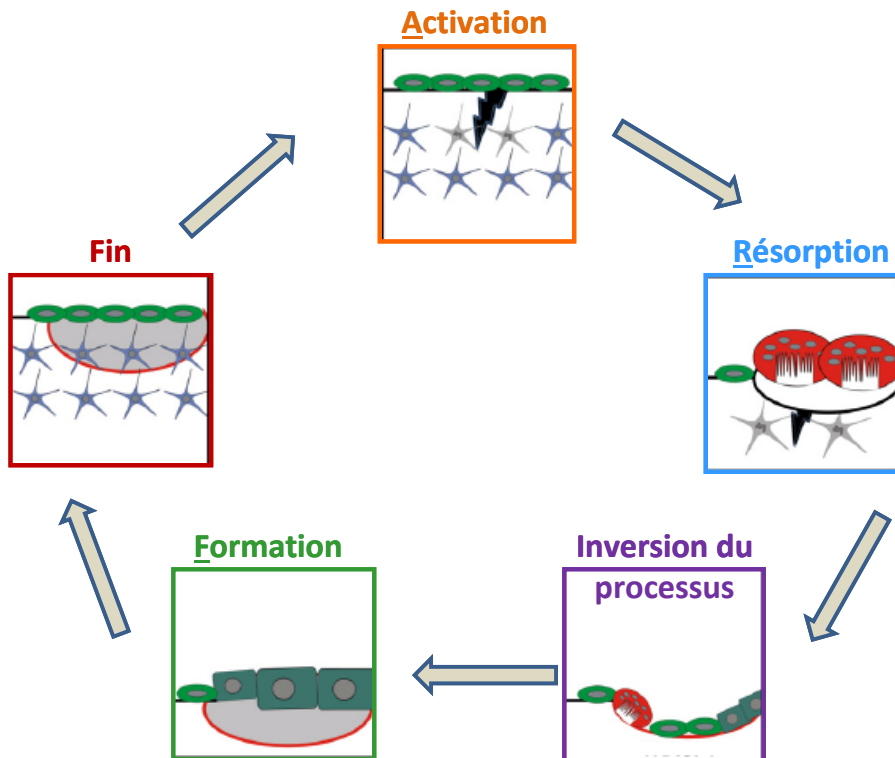
La mise en place d'une BMU a lieu au moment de l'initiation du cycle du remodelage. Les unités de remodelage sont l'objet d'une régulation très fine dans le temps et dans l'espace. Les ostéoclastes se trouvent à l'avant de la BMU pour résorber l'os ancien. A l'arrière de la BMU, se trouvent les ostéoblastes qui interviennent secondairement pour former une nouvelle matrice osseuse. L'os est formé de millions de BMU actives à tout instant et progressant de façon asynchrone dans le tissu osseux pour en assurer son renouvellement. Chaque BMU est indépendante, géographiquement et temporellement, ce qui met en évidence le caractère local du remodelage et le rôle majeur du renouvellement dans celui-ci. Les BMU de l'os trabéculaire, qui sont en relation avec la moelle osseuse hématopoïétique, ont une densité et une fréquence de renouvellement plus importantes que celles de l'os cortical (tableau II-3).

	Os cortical	Os trabéculaire
Nombre d'unités de remodelage -par mm <sup>3</sup> de tissu osseux -dans le squelette	0.2 0.3x10 <sup>6</sup>	4 1.4x10 <sup>6</sup>
Nombre de BMU activées par heure	100	760
Renouvellement global (% par an)	3-4	25

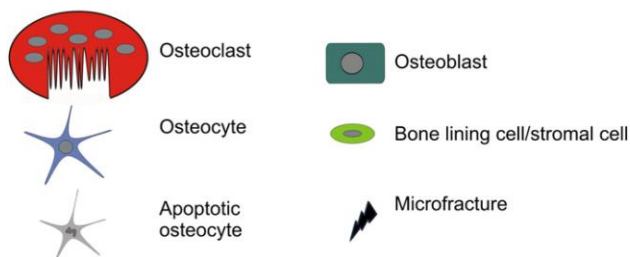
**Tableau II-3 : Densité et fréquence de renouvellement des BMU chez l'homme adulte.**  
(Giudicelli and Souberbielle 1998).

### **b) Les étapes du remodelage osseux et les mécanismes cellulaires associés**

Le remodelage osseux se déroule de façon séquentielle, selon un schéma cyclique connu sous l'acronyme ARF désignant la succession des trois phases principales d'Activation/Résorption/Eformation (Parfitt 2001). Ce cycle est représenté sur la figure II-14. Chez l'homme, un cycle de remodelage dure environ 200 jours (Eriksen, Melsen et al. 1984).



Légende des éléments figurés :



**Figure II-14 : Cycle ARF du remodelage osseux**

Le remodelage osseux est initié suite à des modifications de charges locales, des micro-fractures ou bien encore des modifications du métabolisme minéral. Le cycle du remodelage débute par une phase de résorption de la matrice osseuse par les ostéoclastes. A la suite de cette phase, les ostéoclastes se détachent et meurent par apoptose tandis que les précurseurs des ostéoblastes entament leur processus de différenciation en cellules matures. Il s'agit de la phase d'inversion du processus. Les cellules ostéoblastiques matures synthétisent alors une nouvelle matrice osseuse et comblent la lacune de résorption. A l'issue de cette étape de formation osseuse, les ostéoblastes deviennent des cellules bordantes, meurent par apoptose ou se laissent inclure dans la matrice où ils deviennent des ostéocytes (adapté d'après Henriksen, Neutzsky-Wulff et al. 2009).

- **Activation du cycle de remodelage**

A l'état latent, la présence de cellules bordantes (ou bone lining cells) recouvrant la majorité de la surface osseuse empêche l'accès de cette surface aux ostéoclastes. La première étape du remodelage osseux implique la détection d'un signal initiateur du remodelage par les cellules osseuses. Ce signal peut être :

- **D'origine mécanique**, en réponse aux variations des contraintes mécaniques s'exerçant sur l'os ou suite à l'apparition d'une micro-fracture. La détection d'un stimulus mécanique est assurée par les ostéocytes, cellules de la matrice osseuse dont les prolongements cytoplasmiques forment un réseau interconnecté de canalicules sensibles aux variations des contraintes mécaniques. La survenue de micro-fractures dans l'os (Gu, Mulari et al. 2005; Hazenberg, Freeley et al. 2006) ou la perte des contraintes mécaniques dans un modèle de suspension hypodynamique (Aguirre, Plotkin et al. 2006) entraînent la mort cellulaire des ostéocytes et une augmentation subséquente de l'ostéoclastogénèse.

Les mécanismes par lesquels les ostéocytes modulent l'ostéoclastogénèse sont complexes et ne sont pas entièrement connus à l'heure actuelle. Il semblerait que la mort cellulaire des ostéocytes entraîne à la fois la levée de signaux inhibiteurs de l'ostéoclastogénèse et la libération de signaux pro-ostéoclastiques. A l'état basal, les ostéocytes secrètent le TGF- $\beta$  (Transforming Growth Factor- $\beta$ ), qui possède des effets inhibiteurs sur l'ostéoclastogénèse. L'apoptose des ostéocytes générerait une diminution locale de la concentration en cette molécule, entraînant une levée du signal inhibiteur de l'ostéoclastogénèse pour permettre la fusion des ostéoclastes (Heino, Hentunen et al. 2002). A l'état basal, les ostéocytes ont aussi la capacité de stimuler la formation des ostéoclastes via la synthèse de la molécule pro-ostéoclastique RANKL (Receptor Activator of Nuclear factor  $\kappa$ -B Ligand). La question de savoir comment les ostéocytes pouvaient à la fois subir une mort cellulaire et augmenter le niveau de production de RANKL pour initier la résorption s'est longtemps posée. En 2012, l'équipe de Schaffler a apporté une réponse potentielle en montrant que les activités d'apoptose et de synthèse de RANKL étaient réalisées par deux populations distinctes d'ostéocytes. Les ostéocytes entrant en apoptose sont ceux localisés dans le voisinage immédiat de la micro-fracture. L'élévation du niveau de RANKL concerne les ostéocytes situés à proximité des ostéocytes apoptotiques. Ces observations suggèrent donc que les

ostéocytes apoptotiques donnent le signal aux ostéocytes voisins « sains » de moduler l'ostéoclastogénèse et la résorption (Kennedy, Herman et al. 2012).

- **D'origine hormonale**, en réponse notamment à des changements systémiques de l'homéostasie calcique. Ainsi, l'hormone calcitropique PTH (Parathyroïde Hormone) est un signal de remodelage endocrine mis en jeu par l'hypocalcémie. Brièvement, dans l'os, l'hormone conduit à une stimulation de l'accrétion osseuse en augmentant le nombre et l'activité des ostéoclastes, engendrant secondairement un flux calcique de l'os vers la circulation sanguine. La PTH agit par le biais de son récepteur PTHr (PTH receptor) situé à la surface des cellules ostéoblastiques. Elle déclenche différentes voies de signalisation qui induisent la libération de signaux pro-ostéoclastiques par les ostéoblastes, dont RANKL (Fu, Jilka et al. 2002).

En parallèle, Chambers et al ont montré que les cellules bordantes synthétisent des collagénases (ou métalloprotéases) digérant l'ostéoïde de manière à exposer la matrice minéralisée sous-jacente en préparation à l'attachement des progéniteurs ostéoclastiques (Chambers and Fuller 1985). Il semblerait également que les cellules bordantes expriment le facteur pro-ostéoclastique RANKL (Hauge, Qvesel et al. 2001). Enfin, sous l'effet de la PTH, du calcitriol et de la prostaglandine E2, les cellules bordantes subiraient une rétractation pour permettre le passage des progéniteurs ostéoclastiques via les vaisseaux sanguins jusqu'à la BMU (Leaffer, Sweeney et al. 1995). D'autres auteurs suggèrent que les cellules bordantes participeraient, en collaboration avec les OsteoMacs, à la formation d'une canopée délimitant la BMU au sein de laquelle vont se dérouler les phases de résorption et de formation (Pettit, Chang et al. 2008).

- **Résorption osseuse**

Les précurseurs mononucléés des ostéoclastes sont recrutés, prolifèrent, entrent en contact avec la surface osseuse et se différencient en ostéoclastes matures afin d'exercer leur action de résorption osseuse.

Ces mécanismes dépendent largement des cellules de la lignée ostéoblastique qui, en réponse aux signaux initiateurs du remodelage, participent au contrôle du recrutement, de la différenciation et de la durée de vie des ostéoclastes.

De fait, plusieurs facteurs solubles sont capables de réguler indirectement l'ostéoclastogénèse en agissant sur les ostéoblastes. C'est le cas notamment de la **PTH** (Parathyroid Hormone), du **PTHrP** (Parathyroid Hormone-related Protein), du **TNF- $\alpha$**  (Tumour Necrosis Factor-alpha), de l'interleukine-1 (**IL-1**) et de la **1,25 (OH) $_2$  vitamine D3** (Horwood, Elliott et al. 1998; Ragab, Nalepka et al. 2002; Martin 2005). Ces facteurs solubles agissent en modulant l'expression des cytokines clés de l'ostéoclastogénèse, **M-CSF** (Macrophage-Colony Stimulating Factor), **RANKL** et **OPG** (ostéoprotégérine). Ils induisent une augmentation de l'expression de RANKL et/ou M-CSF par les ostéoblastes, avec éventuellement une diminution de la synthèse du récepteur leurre OPG (Aubin and Bonnelye 2000), de façon à faciliter le recrutement et la formation des ostéoclastes et promouvoir leur activité (Ma, Cain et al. 2001). Partridge a montré que l'administration de PTH chez le rat déclenche la production par les ostéoblastes de **MCP-1** (Monocyte Chemoattractant Protein-1), une chimiokine impliquée dans le recrutement des pré-ostéoclastes sur le site de remodelage (Li, Qin et al. 2007). L'expression des récepteurs de MCP-1 par les pré-ostéoclastes est induite par RANKL.

Un autre niveau de régulation en réponse aux signaux de remodelage de nature endocrine (Kahn and Partridge 1987) ou mécanique (Yang, Chien et al. 2004) passe la sécrétion d'enzymes de type **MMPs** (Matrix-MetalloProteinases) par les ostéoblastes. La dégradation de l'ostéoïde par les MMPs permet l'exposition à la surface osseuse minéralisée de peptides RGD (Arginine, Glycine, Acide Aspartique), motifs d'adhésion reconnus par les intégrines  $\alpha_v\beta_3$  des ostéoclastes (McHugh, Hodivala-Dilke et al. 2000). Une fois associés à la matrice, les ostéoclastes matures acidifient leur environnement par la libération de protons. De cette action résulte une dissolution de la phase minérale du tissu osseux, qui est suivie d'une phase de digestion de la matrice collagénique sous l'effet de plusieurs enzymes (cathepsines K, hydrolases, collagénases,...) (Saftig, Hunziker et al. 1998). Au cours de la dégradation, des facteurs chimio-attractants emprisonnés dans la matrice, tels que l'**ostéocalcine** et des **peptides collagéniques de type 1**, sont libérés à la surface osseuse. Ces molécules, synthétisées par les ostéoblastes et déposées dans la matrice au cours de la formation osseuse, possèdent un pouvoir attractant pour les monocytes (Malone, Teitelbaum et al. 1982). La libération de ces chimiokines sous l'action catabolique des ostéoclastes a pour effet d'attirer des précurseurs ostéoclastiques supplémentaires sur le site de remodelage.

- **Inversion du processus : phase de transition**

La phase de transition est cruciale pour le couplage entre la résorption et la formation osseuse. Elle nécessite l'action coordonnée de nombreux types cellulaires et la synthèse de facteurs de couplage. Plusieurs études montrent qu'un nettoyage et une préparation de la lacune de résorption sont nécessaires à l'initiation de la formation osseuse (Tran Van, Vignery et al. 1982; Everts, Delaisse et al. 2002). L'identité du ou des types cellulaires responsables de ces opérations reste matière à débat. Il semblerait que les mécanismes fassent appel à des cellules d'origine hématopoïétique et mésenchymateuse. Des cellules de type macrophagique, d'origine hématopoïétique, nettoieraient la lacune en phagocytant les débris de la matrice et en sécrétant des enzymes collagénases (Newby 2008). Il pourrait s'agir des Osteomacs (Osteal Macrophages), macrophages résidents spécifiques du tissu osseux et récemment mis en évidence (Pettit, Chang et al. 2008). Les cellules bordantes, issues de progéniteurs mésenchymateux, seraient responsables de la préparation au comblement de la lacune. Ces cellules déposeraient une matrice collagénique riche en ostéopontine formant une ligne cémentante au fond de la lacune de résorption (Everts, Delaisse et al. 2002).

La phase de transition se caractérise aussi par la stimulation de la différenciation des précurseurs ostéoblastiques dans le but d'activer la formation osseuse dans la lacune de résorption (Martin 2005; Matsuo and Irie 2008). Le tableau II-4 répertorie les principales **molécules de couplage** potentielles intervenant au cours de la phase de transition. Les effets de ces molécules sur la lignée ostéoblastique sont également indiqués.

Osteoclast		Osteoblast	Effects on osteoclast	Effect on osteoblast
TGF- $\beta$ (matrix) <sup>a</sup>	→	TGF R	Various	Enhances bone formation
BMP (matrix) <sup>a</sup>	→	BMP R	Unknown	Enhances bone formation
IGF-II (matrix) <sup>a</sup>	→	IGF R	Unknown	Enhances bone formation
Cathepsin K	→	Unknown	Unknown	Enhances/inhibits bone formation
TRAP	→	GPC4 homolog, TRIP-1	Unknown	Enhances differentiation
Atp6v0d2	→	Unknown	Fusion	Suppresses bone formation
Sphingosine 1-phosphate (S1P)	→	S1P receptor	Attenuates differentiation (intracellular S1P)	Stimulates migration and survival, induction of RAN (secreted S1P)
mim-1	→	Unknown	Unknown	Induces proliferation
PDGF BB	→	PDGF Receptor	Inhibits Differentiation by OPG	Suppresses Differentiation
HGF	→	HGF receptor	Stimulates migration and DNA replication	Stimulates DNA synthesis and proliferation
Wnt?	→	Frizzled, LRP5	Unknown	Enhances differentiation
OCIL	→	?	Unknown	Inhibits differentiation
?	←	OCIL	Inhibits differentiation	Unknown
c-Kit	←	SLF (membrane bound)	Suppresses differentiation	Enhances bone formation
ephrinB2	↔	EphB4	Inhibits differentiation	Enhances differentiation
Connexin	↔	Connexin	Regulates differentiation	Enhances differentiation and bone formation

**Tableau II-4 : Molécules de couplage pendant la phase de transition (Matsuo et al, 2008)**

→ signal des ostéoclastes vers les ostéoblastes

← signal des ostéoblastes vers les ostéoclastes

↔ signal bi-directionnel

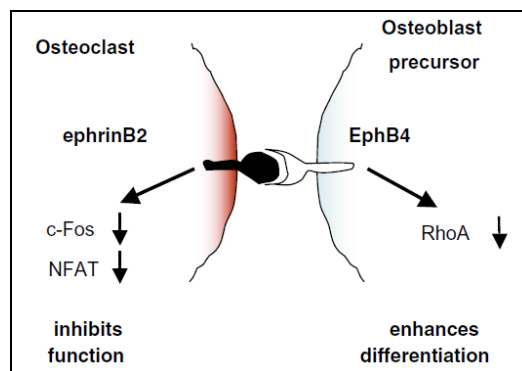
<sup>a</sup>: molécule emprisonnée dans la matrice

Les molécules de couplage agissant sur la formation osseuse ont différentes origines :

- **La matrice osseuse.** Dans les années 80, plusieurs études ont montré que les molécules de couplage agissant sur les ostéoblastes étaient issues de la matrice minérale, dans laquelle elles étaient piégées sous forme inactive avant leur libération au cours de la résorption (Pfeilschifter, D'Souza et al. 1987; Wozney, Rosen et al. 1988). Il s'agit principalement du **TGF- $\beta$** , de **BMPs** (Bone Morphogenetic Proteins) et de l'**IGF-II** (Insulin-like Growth Factor).
- **Les ostéoclastes.** L'ostéoporose maligne infantile (OMI) est une maladie génétique qui affecte le système d'acidification des cellules ostéoclastiques, par la présence de mutations touchant les pompes H<sup>+</sup>-ATPases vacuolaires ou le canal chlore CIC7 des ostéoclastes. Les patients OMI possèdent des ostéoclastes peu fonctionnels, incapables de résorber correctement l'os. Toutefois, même en l'absence de molécules pro-ostéoblastiques libérées par la résorption de la matrice, les patients OMI ont une formation osseuse ostéoblastique préservée (Karsdal, Henriksen et al. 2005; Del Fattore, Peruzzi et al. 2006). Ces observations suggèrent que le nombre d'ostéoclastes est crucial pour la formation osseuse, indépendamment de la bonne résorption de la matrice. Les ostéoclastes sont en effet source de molécules de



couplage (Martin and Sims 2005). Les inducteurs ostéoclastiques de l'ostéoformation existent sous forme sécrétée ou membranaire. Parmi les formes sécrétées, peuvent être citées la phosphatase **TRAP** (Type V tartrate-resistant acid phosphatase - (Sheu, Schwarz et al. 2003)), la sphingosine 1-phosphate (**S1P**- (Ryu, Kim et al. 2006)), **mim-1** (myb-induced myeloid protein-1 – (Falany, Thames et al. 2001)), **HGF** (Hepatocyte Growth Factor – (Grano, Galimi et al. 1996)) ou l'homodimère **PDGF BB** (B polypeptide chain Platelet-Derived Growth Factor – (O'Sullivan, Naot et al. 2007)). Sous la forme membranaire, il faut notamment noter l'importance du système bidirectionnel **EphrinB2/EphrineB4** qui fonctionne comme un « switch » de la résorption vers la formation. La liaison de l'éphrine B2, située à la membrane des ostéoclastes, avec son récepteur EphrinB4 sur la membrane des précurseurs ostéoblastiques inhibe la fonction des ostéoclastes tout en favorisant la différenciation des ostéoblastes (figure II-15) (Zhao, Irie et al. 2006).



**Figure II-15 : Signalisation bidirectionnelle médiée par ephrinB2**

L'EphrinB2 est localisée à la membrane des ostéoclastes et son récepteur EphB4 est situé sur la membrane des progéniteurs mésenchymateux.

Enfin, un autre médiateur important pour la phase de transition résorption/formation semble être l'ostéocyte. A l'état basal, la sécrétion de sclérostine par les ostéocytes est défavorable à la signalisation Wnt, voie inductrice de la formation osseuse. Au cours de la transition, une inhibition de l'expression de la sclérostine par les ostéocytes pourrait avoir lieu afin de permettre l'amorçage de la voie de signalisation anabolique (Robling, Niziolek et al. 2008).

- **Formation osseuse**

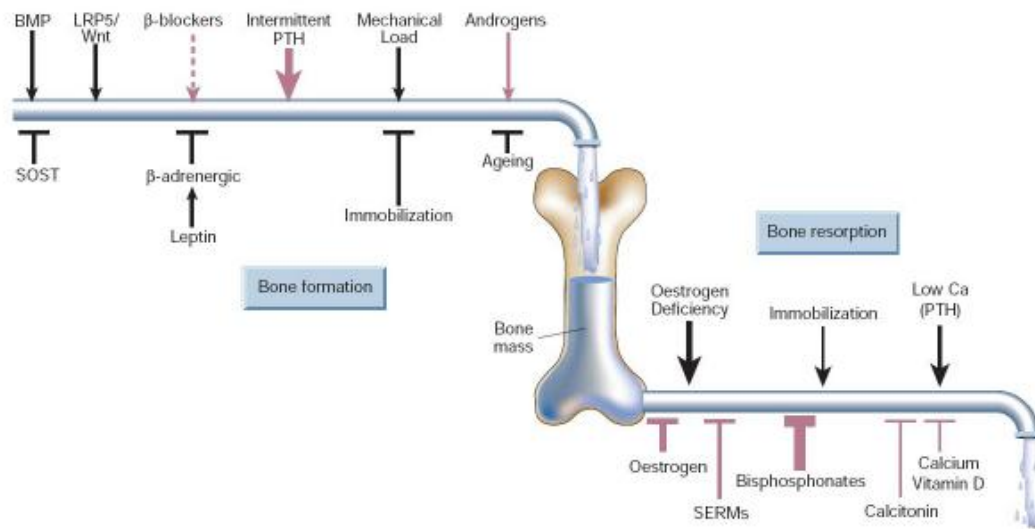
Les pré-ostéoblastes recrutés au niveau de la BMU se différencient en ostéoblastes matures chargés de combler la lacune de résorption en apposant une nouvelle matrice organique, le tissu ostéoïde, qui sera ensuite minéralisé. La phase de formation est la plus longue du cycle ARF et dure approximativement 150 jours (Eriksen, Melsen et al. 1984). La vitesse d'apposition de la matrice osseuse est initialement élevée, puis fléchit au fur et à mesure que la lacune de résorption se comble (Eriksen, Melsen et al. 1984).

- **Fin du cycle de remodelage**

Le cycle de remodelage se conclut lorsqu'une quantité équivalente d'os résorbé a été remplacée. Les signaux de terminaison informant la machinerie de remodelage de s'arrêter sont mal connus, bien qu'émerge l'importance de la voie de signalisation sclérostine dans ce mécanisme. La sécrétion de sclérostine par les ostéocytes, suspendue au cours de la formation osseuse, pourrait reprendre progressivement de façon à inhiber graduellement la néo synthèse osseuse (Tatsumi, Ishii et al. 2007; Moester, Papapoulos et al. 2010). Comme déjà évoqué précédemment, la plupart des ostéoblastes meurt par apoptose à l'issue de la minéralisation. D'autres deviennent ostéocytes et certains acquièrent un phénotype de cellules bordantes.

### **c) Les modulateurs du remodelage osseux**

L'activité des ostéoblastes et des ostéoclastes assurant l'équilibre physiologique entre formation et résorption osseuse est régulée par de nombreux facteurs de nature moléculaire ou mécanique. Dans certaines conditions physiopathologiques, des situations de déséquilibre peuvent survenir, liées le plus souvent à une augmentation de la résorption osseuse et/ou une diminution de la formation osseuse (figure II-16).



**Figure II-16 : Facteurs modulateurs du remodelage osseux favorisant la formation osseuse ou l'ostéo-résorption.**

Abréviations : BMP: Bone Morphogentic Proteins, SOST: Sclerostin, LRP5: Low-density lipoprotein-Receptorrelated

Protein 5, Wnt: Wint, PTH: ParaThyroid Hormone, SERMs: Selective Estrogen Receptor Modulators.

((Harada, Balena et al. 1995)

### ***(1) Facteurs moléculaires locaux***

Il s'agit principalement de **facteurs de croissance** et de **cytokines**. Leur origine est diverse : ils peuvent être relargués par la matrice au cours du remodelage, directement produits par les ostéoclastes, les ostéoblastes, leurs précurseurs, ou bien encore par les nombreuses cellules immunitaires présentes dans l'environnement.

Les principaux facteurs locaux et leurs effets sur le remodelage sont cités dans le tableau ci-dessous.

Nom du facteur	Source	Effets sur les ostéoblastes	Effets sur les ostéoclastes	Références
<b>TGF-β (m)</b>	Variée : Ob, Oc, chondrocytes, cell. Endo.	Stimule ostéoblastogenèse, différenciation ostéocytaire Stimule production collagène I et ostéopontine	Diminue ostéoclastogenèse, peut induire l'apoptose des Oc	(Wozney, Rosen et al. 1988; Suda, Takahashi et al. 1999; Soltanoff, Yang et al. 2009)
<b>BMPs (m)</b>	Ob	Stimulent ostéoblastogenèse, activent expression des marqueurs ostéoblastiques, favorisent l'angiogenèse		(Yamaguchi, Ishizuya et al. 1996; Cheng, Jiang et al. 2003)
<b>IGFs (m)</b>	Ob, ostéocytes	Stimulent ostéoblastogenèse et survie des Ob Augmentent production de collagène I et ostéocalcine		(Hock, Centrella et al. 1988; Hill, Tumber et al. 1997)
<b>FGF (m)</b>	Ob	Stimule ostéoblastogenèse Augmente synthèse de PAL et ostéocalcine	Favorise différenciation et activité des Oc	(Kawaguchi, Chikazu et al. 2000; Marie 2003)
<b>PGE2</b>	Ob	En administration intermittente : effets anaboliques Augmente différenciation des Ob	En administration continue : effets cataboliques Stimule ostéoclastogenèse via augmentation de RANKL et diminution d'ostéoprotégérine par les Ob	(Kobayashi, Take et al. 2005; Choudhary, Halbout et al. 2007; Tian, Zhang et al. 2008)
<b>TRAP</b>	Oc	Stimule différenciation des Ob		(Sheu, Schwarz et al. 2003)
<b>IL-1</b>	Variée : Ob, macrophages	En administration continue, diminue activité chimiotactique des Ob	Stimule ostéoclastogenèse en synergie avec RANKL Stimule production de PGE2 et RANKL par les Ob	(Boyle, Simonet et al. 2003; Hengartner, Fiedler et al. 2013)
<b>IL-6</b>	Variée : Ob, macrophages		Stimule indirectement ostéoclastogenèse en augmentant production RANKL par les Ob Diminue ostéoclastogenèse par action directe sur progéniteurs Oc	(Ishimi, Miyaura et al. 1990; Yoshitake, Itoh et al. 2008)
<b>TNF-α</b>	Variée : Ob, macrophages	Stimule production de M-CSF et RANKL par les progéniteurs ostéoblastiques et les Ob. Inhibe différenciation ostéoblastique Inhibe Runx2 et collagène I	Stimule activité de résorption. En présence de M-CSF, stimule directement ostéoclastogenèse Stimulation indirecte de l'ostéoclastogenèse via RANKL/OPG par les Ob	(Azuma, Kaji et al. 2000; Lam, Takeshita et al. 2000; Gilbert, He et al. 2002; Kitaura, Zhou et al. 2005)
<b>OCIL</b>	Ob, macrophages	Inhibe différenciation des Ob	Inhibe différenciation des Oc	(Zhou, Kartsogiannis et al. 2001; Nakamura, Ly et al. 2007)
<b>PDGF BB</b>	Oc	Inhibe ostéoblastogenèse et activité des Ob	Stimule ostéoclastogenèse	(Zhang, Chen et al. 1998; Kubota, Sakikawa et al. 2002)
<b>IFN-β</b>	Fibroblastes		Inhibe ostéoclastogenèse	(Takayanagi, Kim et al. 2002)
<b>INF-γ</b>	Lymphocytes T		Inhibe ostéoclastogenèse	(Takayanagi, Ogasawara et al. 2000)

**Tableau II-5 : Principaux facteurs locaux impliqués dans le contrôle du remodelage osseux.**

Légende : (m) pour matrice signifie que le facteur est emprisonné dans la matrice, Ob : ostéoblaste, Oc : ostéoclaste, TGF-β : Transforming Growth Factor β, BMPs : Bone Morphogenic Proteins, IGFs : Insulin Growth Factors, FGF : Fibroblast Growth Factor, PGE2 : Prostaglandine E2, IL-1 : Interleukine-1, IL-6 : Interleukine-6, TNF-α : Tumor Necrosis Factor α, OCIL : Osteoclast Inhibitory Lectin, PDGF BB : Platelet-derived Growth Factor BB, IFN-β : Interféron β, INF-γ : Interféron γ, Cell. Endo. : cellules endothéliales.

## (2) Facteurs moléculaires systémiques

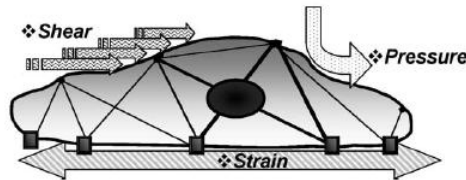
Le tissu osseux est sous l'influence de nombreuses hormones, parmi lesquelles des hormones impliquées dans la **régulation de la prise alimentaire**, des **hormones calciotropes**, des **hormones sexuelles** ou encore des **hormones thyroïdiennes**. Les effets de ces différents facteurs sont résumés dans le tableau ci-dessous :

<b>Hormones impliquées dans la prise alimentaire</b>		
<b>leptine</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Effets anaboliques directs par fixation sur les ostéoblastes.</li> <li>• Effets cataboliques indirects, <i>via</i> la production de noradrénaline par l'hypothalamus qui entraîne la synthèse de RANKL par les ostéoblastes.</li> </ul>	Thomas, Gori et al. 1999) (Elefteriou, Takeda et al. 2004)
<b>insuline</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Effets anaboliques directs par fixation sur les ostéoblastes.</li> <li>• Effets cataboliques indirects en stimulant la production d'ostéocalcine par les ostéoblastes.</li> </ul>	(Thrailkill, Lumpkin et al. 2005; Ferron, Wei et al. 2010)
<b>Hormones calciotropes</b>		
<b>Parathormone (PTH)</b>	Mode d'action complexe, selon le mode d'administration : <ul style="list-style-type: none"> <li>• Effets anaboliques lors d'une administration intermittente : augmente la survie, la prolifération et l'activité des ostéoblastes.</li> <li>• Effets cataboliques lors d'une administration continue : augmente RANKL et diminue OPG</li> </ul>	(Swarthout, D'Alonzo et al. 2002) (Weinstein, Jilka et al. 2010) (Horwitz, Tedesco et al. 2005)
<b>calcitonine</b>	Inhibiteur de la résorption par liaison directe aux ostéoclastes : inhibition de leur activité et augmentation de leur apoptose.	(Chambers, Athanasou et al. 1984)
<b>calcitriol (1-25(OH)<sub>2</sub>D3)</b>	Stimule l'expression de PAL, d'ostéocalcine et de collagène I par les ostéoblastes. Favorise également la différenciation ostéocalcique via la production de RANKL par les ostéoblastes.	(White, Gardiner et al. 1998) (Suda, Takahashi et al. 1999)
<b>Hormones sexuelles</b>		
<b>estrogènes</b>	Inhibiteurs de la résorption osseuse en bloquant l'ostéoclastogénèse et en induisant l'apoptose des ostéoclastes. Inhibiteurs de l'activation du remodelage osseux (action anti-apoptotique sur les ostéocytes). Favorise la prolifération des pré-ostéoblastes.	(Nakamura, Ly et al. 2007) (Shevde, Bendixen et al. 2000) (Khosla, Oursler et al. 2012) (Fujita, Urano et al. 2002)
<b>androgènes</b>	Favorisent l'accrétion osseuse en augmentant la prolifération et la différenciation des précurseurs ostéoblastiques.	(Kasperk, Wergedal et al. 1989) (Chen, Kaji et al. 2004)

**Tableau II-6 : Facteurs systémiques impliqués dans la régulation du remodelage osseux et leurs modes d'action.**

### (3) Contraintes mécaniques

Le tissu osseux reçoit en permanence des sollicitations mécaniques. Les cellules situées en son sein subissent des contraintes constantes liées aux forces de tension, de compression, d'étirement et de cisaillement comme montré sur la figure II-17 (Robling, Castillo et al. 2006).

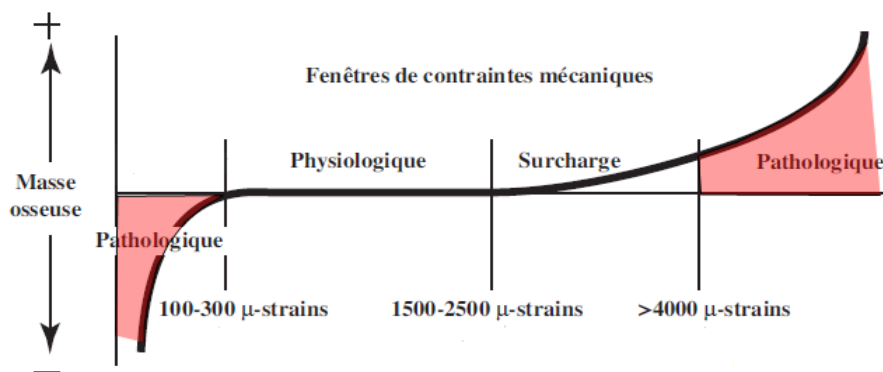


**Figure II-17 Forces mécaniques s'exerçant dans l'environnement des cellules osseuses.**

Le tissu osseux est soumis à plusieurs types de stimulations mécaniques : des forces de tension (strain), de compression (pressure) et de cisaillement (shear) (source : Rubin et al. 2006)

Lors d'une contrainte, le tissu osseux se déforme, entraînant des déformations locales, rapportées en microdéformations ou microstrains ( $\mu\epsilon$ ). Mille microstrains correspondent à une modification de la longueur de l'os de 0,10 %. La préservation de l'intégrité du tissu osseux nécessite l'adaptation de ce dernier aux microdéformations.

Cette adaptation aux variations de contraintes a été conceptualisée par Frost, sous la forme du modèle du « mécanostat », grâce auquel l'os adapte son niveau de remodelage lorsqu'il perçoit un changement de régime de contraintes (Frost 1987). Dans son modèle, Frost distingue différentes « fenêtres » de contraintes, correspondant à différents niveaux de déformation osseuse générés par un stimulus mécanique (figure II-18).



**Figure II-18 : Fenêtres de contraintes mécaniques définies par la théorie du mécanostat de Frost (Forwood and Turner 1995))**

Lorsque les stimuli mécaniques sont d'ordre physiologique, la fenêtre de contraintes dans laquelle se situe le tissu osseux est dite « de confort » ou « à l'équilibre » : l'activité de résorption est au même niveau que l'activité de formation osseuse. Pour des niveaux de contraintes plus élevés, l'os en situation de surcharge s'adapte en augmentant l'activité de formation osseuse. Cette adaptation est possible jusqu'à un seuil de sur-utilisation au-delà duquel les fractures surviennent. Dans les situations inverses, correspondant à des régimes de bas niveau de contraintes, il se produit une perte osseuse causée par un déséquilibre de la balance résorption/formation osseuse en faveur de la résorption (Forwood and Turner 1995).

Les mécanismes contrôlant le mécanostat sont complexes puisqu'ils exigent la conversion d'une force biophysique en une réponse biologique cellulaire (Duncan and Turner 1995). Cette transformation de signal, appelée mécanotransduction, met en jeu des structures cellulaires mécanoréceptrices et des molécules impliquées dans l'adhérence des cellules à la matrice osseuse. De part leur localisation intramatrielle et grâce aux nombreuses connexions qu'ils établissent avec les cellules de leur voisinage, les ostéocytes sont les maîtres d'œuvre de ces mécanismes adaptatifs (cf chapitre II-A-5-1-f).

#### Brèves considérations concernant les modèles d'étude animaux et humains pour l'investigation des effets des variations de contraintes sur le tissu osseux :

- Cas de l'**augmentation** des contraintes mécaniques

La pratique d'un exercice physique chez l'homme engendre des contraintes mécaniques importantes sur le tissu osseux. La littérature permet de distinguer deux types de pratiques sportives : des pratiques sportives ostéogéniques et non ostéogéniques.

Certains sports tels que le cyclisme ou la natation, qui se pratiquent sans impacts répétitifs (voire même dans des conditions de décharge mécanique pour la natation), n'entraînent pas de gain de la masse osseuse (Stewart and Hannan 2000). A l'inverse, la gymnastique, la course à pieds, le tennis, l'haltérophilie sont quelques exemples de pratiques sportives dans lesquelles un contact physique et/ou des forces ou des contraintes de rotation induisent un bénéfice osseux. Ainsi, chez le joueur de tennis de haut niveau, une augmentation de la masse osseuse et de l'épaisseur corticale de l'humérus est observée pour le bras dominant (Haapasalo, Kontulainen et al. 2000). Des modèles murins de course forcée sur tapis roulant

ou d'exercice volontaire dans une roue de type écureuil ont vu le jour afin d'étudier en laboratoire les effets des contraintes mécaniques sur l'os au cours d'un exercice physique. Ainsi, les études de Holy ont montré qu'il se produit dès la première semaine d'exercice volontaire chez le rat une augmentation de l'expression de la phosphatase alcaline et des paramètres de formation osseuse. Chez ces mêmes animaux, le gain osseux lié à la course intervient à partir de la troisième semaine (Holy and Zerath 2000). L'étude des effets purs de la contrainte mécanique sur le tissu osseux est difficile à mener dans le cadre de la pratique sportive, dans la mesure où cette dernière engendre des modifications physiologiques (hormonales, cardio-vasculaires, métaboliques...) qui sont susceptibles d'influencer directement la réponse osseuse. Pour contourner ceci, des modèles animaux de mise en contrainte du tissu osseux par application de compressions localisées ou de vibrations à hautes fréquences à l'échelle de l'animal entier ont été développés. L'équipe de Rubin a été la première à montrer chez la brebis qu'une séance quotidienne de 20 minutes sur table vibrante, à raison de cinq séances par semaine pendant un an, engendre un gain osseux trabéculaire significatif (Rubin, Turner et al. 2001).

- Cas de la **diminution** des contraintes mécaniques

Cette situation peut s'observer dans quatre grandes conditions physiques :

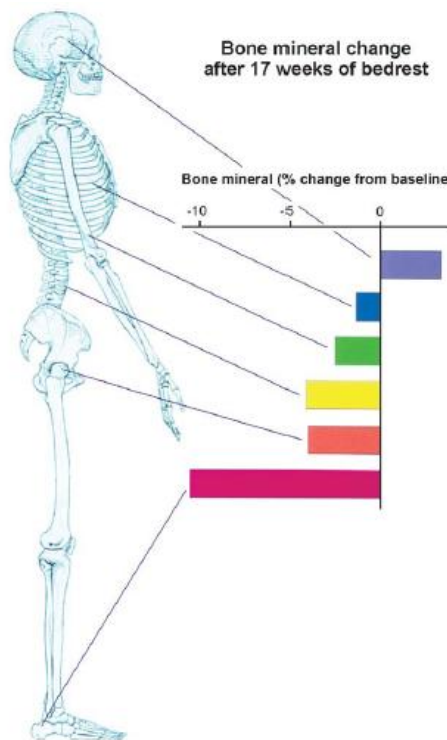
- La microgravité
- L'immobilisation par alitement prolongé
- La diminution d'activité physique
- La décharge mécanique (rencontrée en milieu aquatique, il s'agit d'une diminution de la charge perçue par l'organisme entier).

Selon la condition, la diminution des contraintes mécaniques revêt un caractère hypokinésique (diminution des mouvements et de la mobilité), hypodynamique (diminution de la charge supportée), ou bien combine les deux à la fois.

Les premières données sur la réponse osseuse à la **microgravité** sont apparues au milieu des années 60, à l'issue des vols spatiaux du programme américain Gemini. Les mesures densitométriques réalisées à l'époque sur dix membres d'équipage avait décelé une diminution de la densité minérale osseuse au niveau d'os porteurs, tels que le calcaneum par exemple (Mack, LaChance et al. 1967). Par la suite, l'ensemble des études menées chez les spationautes a confirmé qu'il se produit, au cours d'un vol spatial, une perte osseuse localisée essentiellement au niveau des os porteurs. Pour les missions de quatre à six mois,



le taux mensuel de perte de densité minérale a été estimé entre 0.5% et 1.5% (LeBlanc, Schneider et al. 2000; Lang, LeBlanc et al. 2004). Les études ont montré que l'ostéopénie de microgravité est liée à une augmentation du turn-over osseux, avec une diminution de la formation osseuse et une résorption osseuse accrue (Smith, Wastney et al. 1999; Caillot-Augusseau, Vico et al. 2000). Les études rapportant les effets de la microgravité sur le squelette animal sont, de façon générale, en accord avec les résultats trouvés chez l'homme. La microgravité induit des altérations tissulaires et cellulaires au niveau des os porteurs chez le rat, avec une diminution de la masse osseuse trabéculaire (Vico, Chappard et al. 1988). Au niveau cellulaire, les analyses histomorphométriques révèlent que la perte osseuse est essentiellement liée à une diminution de la formation osseuse (Morey and Baylink 1978; Zerath, Holy et al. 2000).



**Figure II-19 : Changements de masse osseuse observés après 17 semaines de décubitus orthostatique.**

La plus grande perte osseuse concerne le calcanéum, suivie de la partie proximale du fémur et des vertèbres lombaires (Robling, Castillo et al. 2006).

L'**immobilisation** par alitement prolongé, qu'il soit volontaire ou pathologique, modifie la répartition de la gravité sur le squelette et entraîne une mise en décharge mécanique des os porteurs qui s'apparente à de la microgravité. Un modèle de microgravité simulée a été mis au point chez l'homme : il s'agit du décubitus en position anti-orthostatique. Aussi appelé *bed rest*, ce modèle consiste à aliter une personne pendant plusieurs semaines, tête inclinée vers le bas selon un angle de quatre à six degrés. La figure II-19 récapitule les changements observés dans la masse osseuse de différents os après dix-sept semaines d'alitement orthostatique (Leblanc, Schneider et al. 1990). L'étude a permis de montrer que la perte des contraintes mécanique n'affecte pas de la même façon tous les os du squelette : les plus grandes pertes de masse osseuse sont détectées au niveau des membres inférieurs. D'un point de vue

histomorphométrique, une diminution de la formation osseuse et une augmentation de l'accrétion osseuse sont observées (Vico, Chappard et al. 1988).

Comme chez l'homme et pour les mêmes raisons, il est difficile de disposer de données sur la réponse du tissu osseux à la microgravité chez l'animal. Des modèles animaux d'immobilisation ou de simulation de la microgravité ont donc été développés. Citons certains modèles murins de chirurgie, tels que la sciectomie (section du nerf sciatique), la ténotomie (section tendineuse) ou la section de la moelle épinière, qui engendrent l'immobilisation d'un membre ou du corps entier de l'animal. Ces atteintes nerveuses, invasives et irréversibles, présentent le risque d'être associées à des atteintes vasculaires. Des modèles de plâtrages et bandages de membres existent également. S'ils sont moins traumatisants pour l'animal que les chirurgies de lésion nerveuse, ces modèles restent malgré tout contraignants pour le rongeur et assez mal tolérés. D'autres modèles, davantage similaires au *bed rest* chez l'homme, reposent sur la mise en décharge mécanique des membres porteurs. Le modèle de suspension par la queue (*hindlimb unloading*), initialement mis au point chez le rat par l'équipe de Morey-Holton dans les années 1980, a largement été employé (Morey, Sabelman et al. 1979). Une semaine de suspension suffit à entraîner une diminution du nombre de progéniteurs mésenchymateux médullaires associée à une augmentation de l'accrétion et une diminution de la formation osseuses. L'apoptose des ostéocytes, cellules mécano-sensitives, est induite dès trois jours de suspension chez la souris (Aguirre, Plotkin et al. 2006).

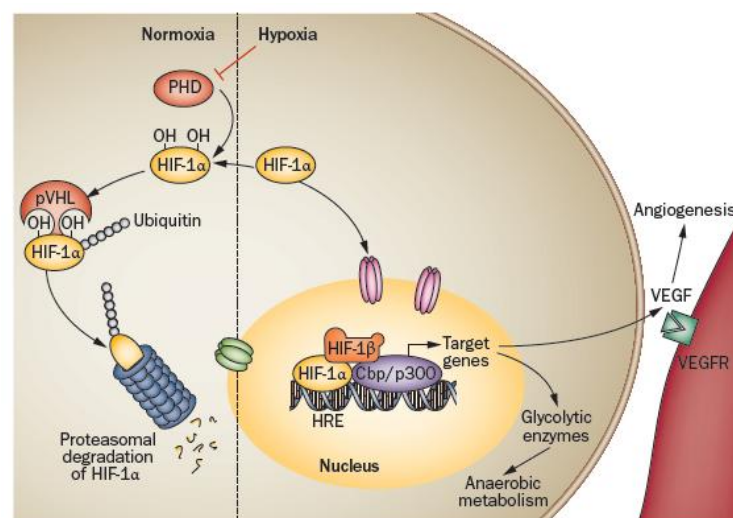
#### **(4) Hypoxie**

##### **(a) La notion d'hypoxie**

L'oxygène est un substrat métabolique indispensable à de nombreuses réactions enzymatiques *in vivo*. La pression partielle en oxygène de l'air inspiré ( $pO_2$ ) au niveau des alvéoles pulmonaires est de 21%. Dans les autres tissus de l'organisme, la valeur de la  $pO_2$  diffère selon le degré de vascularisation de l'organe considéré, pour une valeur moyenne comprise entre 2 et 9 % (Brahimi-Horn, Chiche et al. 2007). Cette faible teneur en oxygène est traditionnellement appelée « hypoxie » par rapport à la concentration en oxygène de l'air ambiant, considérée comme « normoxie ». En 2009, une mise au point sur la sémantique est réalisée par Ivanovic. Ce dernier soutient l'emploi du terme « normoxie in situ » ou « normoxie physiologique » à la place du mot hypoxie pour désigner les faibles

concentrations en oxygène régnant de façon physiologique au sein des différents tissus de l'organisme (Ivanovic 2009). La notion d'**hypoxie tissulaire** est donc un **concept relatif** qui varie en fonction de l'organe considéré.

L'état hypoxique tissulaire affecte directement le métabolisme de la cellule, qui met en place des intermédiaires moléculaires pour s'adapter aux faibles teneurs en oxygène. Parmi les acteurs principaux de l'hypoxie, le facteur de transcription **HIF-1** (Hypoxia-Inducible Factor-1) caractérisé dès 1991 (Semenza, Neufelt et al. 1991) contrôle un grand nombre de processus physiologiques via une modulation de l'expression de certains gènes. Le complexe protéique HIF-1 est constitué de deux sous-unités protéiques de type hélice-boucle-hélice, HIF-1 $\alpha$  et HIF-1 $\beta$  (Bunn and Poyton 1996). La sous-unité HIF-1 $\alpha$  est sensible à la tension en oxygène, alors que HIF-1  $\beta$  est exprimée de façon constitutive et indépendamment du niveau d'oxygène. Dans les tissus pour lesquels la tension en oxygène dépasse 5%, la demi-vie de HIF-1 $\alpha$  n'excède pas cinq minutes. La figure II-20 retrace la signalisation de HIF-1 $\alpha$ .



**Figure II-20 : Voie de signalisation HIF-1 $\alpha$ .**

En condition normoxique, les enzymes prolylhydroxylases (PHD) réalisent une hydroxylation du facteur HIF-1 $\alpha$ . Le HIF-1 $\alpha$  hydroxylé est reconnu par la protéine VHL (Von Hippel-Lindau), ce qui entraîne l'ubiquitination de HIF-1 $\alpha$  et sa dégradation par le protéasome. Lorsque la pO<sub>2</sub> diminue, le facteur HIF-1 $\alpha$  n'est plus hydroxylé et n'est plus soumis à la dégradation par le protéasome. Stabilisé, HIF-1 $\alpha$  entre dans le noyau où il s'accumule avant de s'associer à HIF-1 $\beta$ . Le complexe HIF ainsi formé reconnaît la séquence HRE (Hypoxia Responsive Element). Intervient alors la protéine CBP/p300 (CREB-binding protein) qui, en se liant au complexe HIF, permet l'expression des gènes en aval de la séquence HRE (Maes, Carmeliet et al. 2012).

Une trentaine de gènes est située en aval de la séquence HRE. Ces gènes permettent l'expression des protéines impliquées (tableau II-7) :

- dans l'amélioration de l'apport en oxygène (Vascular Endothelial Growth Factors [VEGF], Erythropoïétine [Epo], inducible Nitric Oxide Synthase [iNOS],...)
- dans le métabolisme martial (Transferrine, ...)
- dans les économies d'énergie (Glucose transporters [GLUTs], enzymes glycolytiques,...)
- dans la survie et la prolifération cellulaires (Epidermal Growth Factors [EGFs], Insuline-like Growth Factor-2 [IGF-2], Transforming Growth Factor-beta [TGF-β],...)
- dans la lutte contre l'acidification du milieu cellulaire (Carbonic Anhydrase 9 [CA9],...)

Genes That Are Transcriptionally Activated by HIF-1

Category	Gene(s)
Glucose metabolism	GLUT1, GLUT3
	HK1, HK2
	GPI
	PFK1, PFK2
	Aldose-A
	TPI
	GAPDH
	PGK1
	PGM
	Enolase-1
	PK-M
	LDHA
	CA9
Metastasis	CATHD
	Collagen V
	MMP2
	UPAR
	PAI1
	LRP1
	AMF/GPI
Cell proliferation	MIC2
	Cyclin G2
	IGF2
	IGF-BP
Cell survival/angiogenesis	TGF-α
	TGF-β
	ADM
	EPO
	NOS2
Iron metabolism	VEGF
	LEP
	LRP1
Drug resistance	Transferrin
	Tf receptor
	Ceruloplasmin
	MDR1

**Tableau II-7: Principaux gènes transcrits en réponse à la signalisation HIF-1α**  
(Krohn, Link et al. 2008)

## (b) Effets de l'hypoxie sur les cellules ostéocompétentes et leurs progéniteurs

La littérature compte un grand nombre d'études *in vitro* qui ont montré que la tension en oxygène serait capable d'influencer le métabolisme osseux en modulant les cellules ostéoblastiques et ostéoclastiques, ainsi que le devenir de leurs progéniteurs respectifs. Toutefois, établir un consensus concernant l'effet direct de l'hypoxie sur les cellules ostéocompétentes à partir des études publiées demeure difficile. La plupart des études est menée à partir de cultures cellulaires placées en conditions atmosphériques avec une PO<sub>2</sub> diminuée (1-8%). Mais les différences expérimentales rencontrées entre laboratoires (différences dans les techniques d'isolation des cellules, des milieux de cultures,...) sont probablement à l'origine d'une certaine **divergence** observée au niveau des résultats (Ma, Grayson et al. 2009). Une variété d'études montre un bénéfice significatif en termes de maintien du « caractère souche » des CSM quand elles sont soumises à une faible pression en oxygène (Grayson, Zhao et al. 2007) (Saller, Prall et al. 2012). La taille des CFU-F ainsi que la prolifération des cellules après confluence des colonies sont augmentées par l'hypoxie (Basciano, Nemos et al. 2011). D'autres études montrent que la culture en hypoxie favorise davantage la différenciation des CSM vers la voie chondrocytaire (Kanichai, Ferguson et al. 2008) ou ostéoblastique (Zou, Han et al. 2011).

Concernant les CSH/PH de mammifère, la culture en condition hypoxique tend à maintenir la quiescence des cellules en diminuant leur prolifération (Eliasson and Jonsson 2010; Eliasson, Rehn et al. 2010). L'équipe de Praloran a montré que la culture à très basse concentration en oxygène (0.1%) induit la quiescence des CSH/PH humaines en phase G<sub>0</sub> du cycle cellulaire (Guitart, Debeissat et al. 2011).

## 2. Réparation osseuse

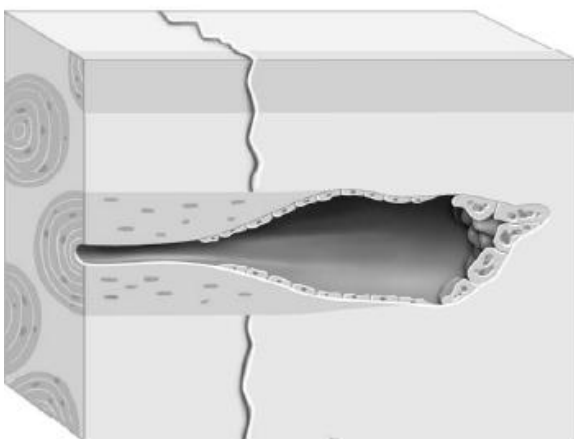
Le tissu osseux possède des propriétés régénératives spontanées. Il est capable, dans le cas de fractures avec une perte modérée de substance, de restaurer l'intégrité physique et fonctionnelle de la zone lésée. Les mécanismes de la réparation osseuse sont complexes. Il s'agit de mécanismes qui se déroulent selon des séquences temporelles et spatiales bien définies et qui requièrent l'action coordonnée de nombreux types cellulaires.

## a) Les différents types de réparation

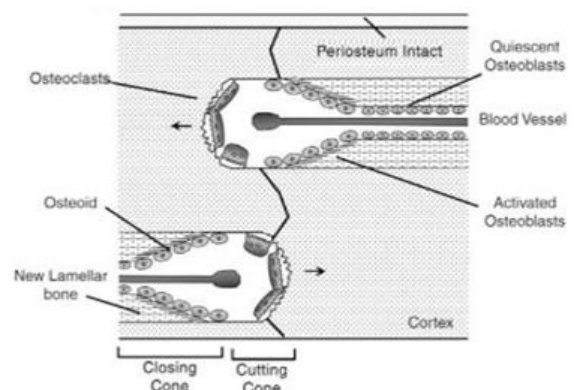
### (1) Directe ou intra/endo-membranaire

Ce mode de réparation est appelé direct car il n'implique pas de phase transitoire cartilagineuse. C'est le mode de réparation des os plats. Cette réparation est observée également pour les os longs, mais exclusivement dans le cadre d'un environnement mécanique d'une extrême stabilité, dans le cas de fractures réduites par fixateur interne ou lors d'un traitement d'ostéosynthèse par plaques par exemple. Outre sa stabilité, le foyer de fracture doit également subir des déformations et des contraintes inter-fragmentaires minimales ne dépassant pas 2% (Stronck and Reichert 2008). Dans la littérature, la réparation directe est définie comme une tentative par l'os cortical de rétablir sa propre continuité. Deux sortes de réparation directe coexistent, en fonction de la distance existant entre les fragments osseux. Jusqu'à 200 µm de distance inter-fragmentaire, on parle de réparation directe par contact, pour laquelle la consolidation corticale est simultanée à la formation des ostéons.

La proximité des fragments permet la formation de nouveaux ostéons à partir d'unités de remodelage appelées cutting cones ou cônes de forage. Les ostéoclastes présents dans la tête du cône forment un tunnel dans la ligne de fracture et résorbent l'os nécrotique, tandis que les ostéoblastes situés en arrière du cône sont responsables de l'accrétion du nouvel os.



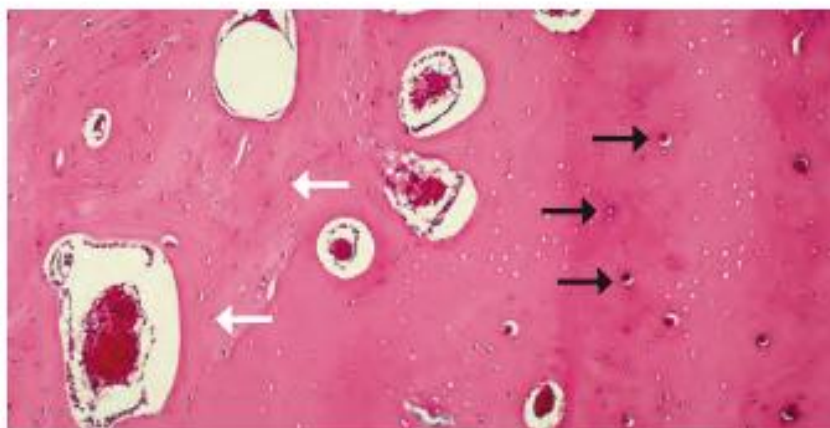
**Figure II-21 : Réparation directe de contact.**  
(Macé 2007)



**Figure II-22 : Réparation directe.**  
(Stronck and Reichert 2008)

Les têtes foreuses des unités de remodelage vont passer directement le foyer de fracture, d'une corticale à l'autre. Les ostéons agissent alors comme des chevilles fixant directement le foyer. L'os lamellaire néo-formé est orienté parallèlement à l'axe de la pièce osseuse.

Pour des espaces inter-fragmentaires plus grands, mesurant jusqu'à 500-800  $\mu\text{m}$ , la consolidation corticale et la formation des ostéons matures n'a pas lieu simultanément. On parle de réparation directe de type « gap healing » ou réparation directe transformationnelle. Les cellules ostéoprogénitrices de la moelle et du périoste envahissent le foyer de fracture où elles se différencient en ostéoblastes. L'espace inter-fragmentaire est alors comblé par l'action des ostéoblastes qui synthétisent un tissu osseux immature perpendiculairement à l'axe de la pièce osseuse. Cette étape initiale dure 3 à 8 semaines chez l'homme. Puis des unités de remodelage sont mises en place et la progression des cônes de forage permet le remplacement de l'os immature par des ostéons matures orientés parallèlement à l'axe de la pièce osseuse (Griffon 2005).



**Photographie II-2 : Réparation osseuse directe.**

Sur cette coupe de diaphyse, les flèches en blanc pointent des ostéons immatures orientés perpendiculairement à l'axe de la pièce osseuse. Ils sont progressivement remplacés par de l'os lamellaire orienté parallèlement à l'axe longitudinal de la pièce osseuse (flèches noires).

**(2) Indirecte ou endochondrale**

La réparation osseuse indirecte s'observe pour les os longs. Contrairement à la réparation endomembranaire, sa mise en place ne requiert pas d'environnement mécaniquement stable. Il s'agit par exemple du type de réparation rencontré pour des fractures non stabilisées, qui peuvent être soumises à des forces mécaniques élevées. Cette réparation est dite « indirecte » car la formation du tissu osseux mature est précédée d'une phase endochondrale avec formation d'un tissu cartilagineux.

## ***Les étapes de la réparation osseuse indirecte***

On distingue quatre grandes étapes qui se succèdent dans le temps :

- Formation d'un hématome, déclenchement d'une réaction inflammatoire et formation du tissu de granulation
- Angiogenèse, recrutement des cellules souches mésenchymateuses et formation du cal mou cartilagineux
- Formation du cal dur par minéralisation du cal mou
- Remodelage

Bien que la réparation indirecte soit présentée comme la succession de quatre étapes distinctes, on constate en réalité que les différentes phases de la reconstruction se superposent dans le temps. Plusieurs étapes coexistent à un temps donné.

### **(a) Formation d'un hématome, déclenchement d'une réaction inflammatoire et formation du tissu de granulation**

Immédiatement après la fracture, la rupture de la vascularisation osseuse et les traumatismes subis par les tissus mous environnants génèrent un hématome et entraînent le déclenchement d'une réponse inflammatoire aiguë.

La coagulation du sang au niveau de l'hématome est déclenchée par l'agrégation et la dégranulation plaquettaire. Le caillot (hématome fracturaire) riche en fibrine formé sur le site lésé participe probablement à l'initiation des mécanismes de réparation, mais de façon encore controversée. En 1969, Ham (Ham and Leeson 1969) note que les mécanismes de réparation prennent préférentiellement place autour de l'hématome interfragmentaire plutôt qu'en son centre. Sur la base de telles observations, des équipes suggèrent que la présence du caillot constitue une entrave au bon déroulement des étapes précoces de la réparation (Harris 1990; Morgan and Leighton 1995). D'autres équipes au contraire décrivent le caillot comme source de cellules contribuant à la formation du cal (Rahn 2002). Dans tous les cas, des études ont montré que l'hématome fracturaire possède un pouvoir ostéogénique puisqu'il est capable de former de l'os lorsqu'il est transplanté dans du tissu musculaire. L'hypothèse la plus communément admise est qu'il promeut la réparation en libérant des signaux chimiotactiques, comme le TGF- $\beta$  (Transforming growth factor- $\beta$ ) et le



PDGF (platelet-derived growth factor), produits par les plaquettes. Une réaction inflammatoire locale s'installe en quelques heures dans les tissus périfracturaires. Elle se traduit par une vasodilatation, une exsudation plasmatique et le recrutement et la migration des différents types cellulaires dont les cellules inflammatoires sur le site lésé. Des granulocytes et des macrophages apparaissent afin de résorber les tissus nécrotiques et des ostéoclastes sont recrutés afin d'éroder les surfaces osseuses. En parallèle, la synthèse de collagène par des fibroblastes permet le remplacement progressif de l'hématome fracturaire en un tissu conjonctif appelé tissu de granulation ou tissu fibreux. Le tissu de granulation, sans tenue mécanique, sera rapidement dégradé et remodelé en cal mou sous l'action de cellules à potentiel ostéogénique.

#### **(b) Angiogenèse, recrutement des cellules souches mésenchymateuses et formation du cal mou cartilagineux**

La formation de nouveaux vaisseaux est coordonnée au processus de réparation car elle permet notamment l'acheminement des différents types cellulaires sur le site de réparation. Il a été montré qu'un défaut de vascularisation peut être à l'origine d'un retard, voire d'une absence de réparation. L'interleukine 1 (IL-1) produite par les macrophages lors de la phase inflammatoire participe à l'angiogenèse du site lésé via l'activation des récepteurs IL-1RI et IL-1RII. L'interleukine 6 (IL-6) semble aussi impliquée dans l'angiogenèse en stimulant la production de VEGF (Vascular –Endothelial Growth Factor).

La mise en place des vaisseaux permet la colonisation du tissu de granulation par des cellules ostéoprogénitrices, les cellules souches mésenchymateuses (CSM). L'origine et la provenance de ces cellules restent encore très discutées. La majorité des données indique que les CSM proviennent du périoste, de l'endoste, de la moelle osseuse et des tissus mous environnants. Ces dernières années, plusieurs études ont établi qu'un **recrutement systémique de CSM circulantes** jusqu'au site lésé participe également aux mécanismes de cicatrisation osseuse ((Kumagai, VasANJI et al. 2008; Kumar and Ponnazhagan 2012). La famille des BMPs (Bone Morphogenetic proteins), notamment BMP-7, joue un rôle dans le recrutement de ces ostéoprogéniteurs. D'autres protéines semblent aussi impliquées dans ce mécanisme, comme la protéine SDF-1 (Stromal derived factor 1) et son récepteur CXCR-4. Kitaori a montré que l'augmentation de SDF-1 au niveau du site de fracture permet le recrutement des CSM exprimant CXCR-4 (Kitaori, Hiromu et al. 2009).

A ce stade de la réparation, on est en présence d'un tissu fibrovasculaire synthétisant différents facteurs de croissance (TGF- $\beta$ , BMP, FGF, PDGF,...) favorables à la différenciation des cellules souches mésenchymateuses qui sont en train de le coloniser. Deux cas de figure sont alors possibles en fonction des conditions environnementales locales. Pour des foyers de fracture très bien stabilisés, l'absence de force de cisaillement s'exerçant sur les vaisseaux sanguins permet le maintien d'une bonne oxygénation du tissu de granulation. En présence d'un taux élevé en oxygène, les CSM se différencient en ostéoblastes qui vont alors constituer directement le cal osseux. Mais la plupart du temps, la faible stabilité mécanique du tissu de granulation occasionne le mouvement des abouts osseux et un cisaillement des vaisseaux sanguins néo-formés. L'interruption de la vascularisation entraîne une diminution locale de la pression partielle tissulaire en oxygène, une condition environnementale qui est favorable à une différenciation des CSM en chondrocytes, entre le 7<sup>ème</sup> et le 21<sup>ème</sup> jour (Mackie, Ahmed et al. 2008). Ces cellules synthétisent et sécrètent un cal cartilagineux riche en collagène II et protéoglycanes (cal mou) qui sera remodelé secondairement en cal osseux (cal dur).

### **(c) Formation du cal dur par minéralisation du cal mou**

Le cal mou cartilagineux apporte la stabilité mécanique au foyer de fracture, une condition indispensable à la minéralisation.

Parvenus à maturation, les chondrocytes inclus au centre de l'ébauche cartilagineuse s'hypertrophient et se mettent à synthétiser des facteurs angiogéniques (VEGF notamment) déclenchant la formation de nouveaux vaisseaux sanguins. Les chondrocytes hypertrophiques subissent ensuite le phénomène d'apoptose tandis que la calcification de la matrice prend progressivement place. Les vaisseaux néoformés envahissent l'espace préalablement occupé par les chondrocytes hypertrophiques et permettent l'apport de cellules ostéoprogénitrices et hématopoïétiques sur site. Les cellules ostéoprogénitrices se différencient en ostéoblastes qui s'accumulent à la surface du cartilage calcifié et commencent à synthétiser l'ostéoïde. Le dépôt de cette matrice riche en collagène I marque le début de la minéralisation. La minéralisation résulte de la précipitation de façon ordonnée de cristaux de phosphate de calcium au sein de la matrice. Les ostéoblastes déposent des vésicules matricielles riches en ions  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{PO}_4^-$  sur les fibrilles de collagène de la matrice.

Cette dernière agit comme agent de nucléation des cristaux et comme support servant à l'organisation des dépôts minéraux.

#### **(d) Remodelage**

La dernière phase de la réparation est le remodelage de l'os primaire en un os cortical ou trabéculaire lamellaire. Cette phase est aussi appelée formation osseuse secondaire. Ce processus de remodelage se déroule comme décrit dans le paragraphe II-B-1. Il débute par une phase de résorption osseuse, accomplie par les ostéoclastes, suivie d'une néo-formation osseuse par les ostéoblastes.

### **b) Les modulateurs de la réparation osseuse**

#### ***(1) Facteurs humoraux (3 classes)***

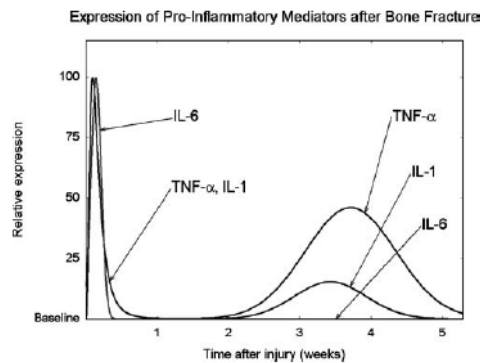
##### **(a) Cytokines pro-inflammatoires**

L'interleukine IL1, l'interleukine IL6 et le TNF- $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ ) jouent un rôle important dans la réparation osseuse. Leur expression est phasique.

Sécrétés par les macrophages dans les premières 24 heures post-fracture, l'IL-1 et le TNF- $\alpha$  induisent le chimiotactisme d'autres cellules inflammatoires et stimulent le recrutement de cellules mésenchymateuses sur le site de lésion. Un second pic de sécrétion de l'IL-1 et du TNF- $\alpha$  intervient au cours des étapes plus tardives de la réparation (remodelage) (Gerstenfeld, Cullinane et al. 2003).

L'IL-6 est synthétisé par les ostéoblastes, en réponse à la stimulation exercée par l'IL-1. Contrairement au TNF- $\alpha$  et à l'IL-1, l'expression de l'IL-6 n'est pas biphasique et se limite à la phase inflammatoire. Dans les modèles murins de réparation osseuse, le niveau d'IL-6 augmente immédiatement après la fracture et retourne à son niveau basal à la fin de la première semaine (Gerstenfeld, Cullinane et al. 2003). Cette cytokine intervient dans la régulation des différenciations ostéoblastique et ostéoclastique. Elle favorise également l'angiogenèse en stimulant la synthèse du VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) (Weber, Li et al. 2010).

Le profil d'expression de ces trois cytokines est résumé sur le schéma ci-dessous :



**Figure II-23 : Profil d'expression temporelle du TNF-α, de l'IL-1 et de l'IL-6 au cours de la réparation osseuse chez la souris.**

Les niveaux de chaque cytokine (déterminés par analyse quantitative des ARNm) sont exprimés en pourcentage du niveau maximal observé sur la période de temps indiquée. Ce schéma ne renseigne pas sur la concentration d'une molécule relativement à une autre (Mountziaris and Mikos 2008).

#### **(b) Facteurs de croissance et membres de la superfamille des TGF-β**

Stimulateur de la réparation osseuse, le **FGF** (Fibroblast-Growth Factor) est produit par les cellules de l'inflammation, les ostéoblastes et les chondrocytes. Il intervient préférentiellement dans les étapes précoces de la réparation (Hughes-Fulford and Li 2011). Le **bFGF** (basic Fibroblast-Growth Factor), qui appartient à la famille des FGF, est un facteur mitogénique jouant un rôle particulièrement important dans la réparation osseuse. Le bFGF est un inducteur de l'angiogenèse, en favorisant notamment la prolifération des cellules endothéliales (Klein, Giancotti et al. 1993). C'est également un stimulateur de l'adipogenèse et de l'ostéogenèse. Ainsi, dans un modèle de rattes développant une ostéopénie consécutive à ovariectomisation, Aguirre a montré que l'injection quotidienne de bFGF exerce une forte stimulation de la formation osseuse (Aguirre, Leal et al. 2007). Au niveau de la lignée mésenchymateuse, le bFGF promeut la prolifération et la différenciation des progéniteurs ostéoblastiques (Hanada, Dennis et al. 1997). Il agit aussi sur les lignées granulo-monocytaires, en favorisant l'ostéoclastogenèse (Nakagawa, Yasuda et al. 1999). Enfin, le bFGF possède une forte affinité pour l'héparine, un des constituants majeurs des protéoglycanes qui composent la matrice osseuse extracellulaire (héparines sulfates). En se

liant à l'héparine libérée par la dégradation de la matrice extracellulaire par les ostéoclastes au cours de la réparation, il a été montré que le bFGF participe à la régulation des activités des ostéoblastes et des ostéoclastes, et qu'il favorise l'angiogenèse (Collin-Osdoby, Rothe et al. 2002; Saijo, Kitazawa et al. 2003).

En 1965, Marshall Urist observe qu'un fragment de matrice osseuse avasculaire, acellulaire et déminéralisée est capable de générer du tissu osseux après implantation en site ectopique, sous la capsule musculaire d'un lapin (Urist 1965). En se basant sur ses études, Urist propose l'existence d'une substance contenue dans la matrice déminéralisée capable d'induire la différenciation des cellules progénitrices en cellules ostéogéniques. Six ans plus tard, la fraction protéique responsable de cet effet est identifiée comme étant les Bone Morphogenetic Proteins (Urist and Strates 1971). Les BMPs appartiennent à la superfamille protéique des TGF- $\beta$ .

Cette superfamille regroupe la plupart des facteurs connus pour induire la formation du cartilage et de l'os au cours du développement embryonnaire, tels que le TGF- $\beta$ , les BMPs, les GDFs (Growth and Differentiation Factors) et les activines (Chang, Brown et al. 2002). Le TGF-  $\beta$  et les BMPs sont particulièrement importants dans le cadre de la réparation.

L'injection de **TGF- $\beta$**  dans des modèles de réparation stimule la formation osseuse *in vivo* chez le rat (Nielsen, Andreassen et al. 1994) et le lapin (Lind, Schumacker et al. 1993). Son mode d'action est multiple. Dans les phases précoces de la réparation, le TGF- $\beta$  est libéré dans l'hématome par la matrice extracellulaire et lors de la dégranulation des plaquettes. A ce stade, le facteur de croissance semble être impliqué dans le recrutement et la prolifération des cellules ostéoprogénitrices dans la modulation de l'inflammation et de l'angiogenèse. Dans les phases plus tardives de la réparation, le TGF-  $\beta$ , qui est synthétisé par les chondrocytes, les ostéoblastes et les ostéoclastes, intervient dans la régulation de la différenciation mésenchymateuse et la production de la nouvelle matrice extracellulaire (Erlebacher, Filvaroff et al. 1998).

Les **BMPs** sont présentes tout au long du processus de réparation (Cho, Gerstenfeld et al. 2002). Plus particulièrement, les BMP-2, BMP-3, BMP-4 et BMP-7 jouent un rôle dans la différenciation ostéoblastique au cours de la réparation. Ils possèdent de nombreux autres

effets, qui varient en fonction du stade de la réparation auquel ils interviennent, du type cellulaire considéré, etc... Ainsi, les BMPs favorisent la réparation osseuse en agissant comme facteurs chimiotactiques (Phillips 2005), en favorisant la prolifération et la différenciation des cellules mésenchymateuses vers la lignée ostéoblastique, mais aussi en facilitant l'angiogénèse (Valdimarsdottir, Goumans et al. 2002) ou bien la minéralisation de la matrice extracellulaire à des stades plus tardifs de la réparation (Hughes-Fulford and Li 2011).

### (c) Facteurs vasculaires

Le **VEGF** (Vascular Endothelial Growth Factor) est le promoteur principal de la formation de nouveaux vaisseaux sanguins, dans les conditions physiologiques et pathologiques. Il joue un rôle majeur dans la réparation osseuse, comme l'ont montré les études de Street et al dans deux modèles de fractures chez la souris et le lapin (Street, Bao et al. 2002).

L'expression du VEGF au cours de la réparation est induite par la plupart des facteurs de croissance ostéo-inducteurs, tels que les BMPs (Deckers, van Bezooijen et al. 2002), les FGFs, (Saadeh, Mehrara et al. 2000), l'IGF-1 (Wang, Yamazaki et al. 1996), le TGF- $\beta$  (Saadeh, Mehrara et al. 1999) mais aussi la PTH (Wang, Yamazaki et al. 1996) et les prostaglandines (Harada, Nagy et al. 1994). Réciproquement, ces facteurs sont régulés par la présence de VEGF (Carano and Filvaroff 2003) (Deckers, van Bezooijen et al. 2002). Enfin, comme décrit dans le chapitre II-B-1-4, l'hypoxie joue également un rôle important dans l'induction de la transcription du gène codant pour le VEGF (Harris 2002). Il a été montré que l'hypoxie stimule l'expression de l'ARNm codant le VEGF par des ostéoclastes et favorise en parallèle l'ostéoclastogénèse (Utting, Flanagan et al. 2010). De plus, Wang a montré que l'hypoxie stimule l'expression du VEGF par des ostéoblastes murins et que les os longs de souris surexprimant le HIF1 $\alpha$  étaient plus denses et plus vascularisés que ceux des souris contrôles (Wang, Wan et al. 2007).

L'existence d'un facteur intervenant dans la régulation et le maintien de la masse érythrocytaire circulante est suspectée dès le début du XX<sup>ème</sup> siècle par Carnot et Deflandre (Carnot and Deflandre 1906). De nombreuses expériences menées dans les années 50

confirment l'existence de ce facteur humoral à action érythropoïétique, nommé **érythropoïétine** (Epo). C'est en 1957 que l'implication des reins dans sa sécrétion est mise en évidence par Jacobson et al qui observent une augmentation significative de la concentration sérique en Epo chez des rats quelques instants après les avoir soumis à une atmosphère hypoxique. Cette augmentation est abolie chez les rats néphrectomisés (Jacobson, Goldwasser et al. 1957). L'hormone cytokinique Epo régule la survie, la prolifération et la différenciation des progéniteurs érythrocytaires (Richmond, Chohan et al. 2005). Synthétisée essentiellement par le cortex rénal et les fibroblastes en réponse à une diminution de la pO<sub>2</sub> sanguine, elle promeut également l'angiogenèse (Anagnostou, Lee et al. 1990).

Mais plus récemment, des effets de l'Epo sur le système osseux ont été mis en évidence, ainsi que son implication dans les mécanismes de réparation osseuse. Des études ont montré une amélioration de la réparation de défauts fragmentaires sous Epo, mais les mécanismes moléculaires sous-tendant le mode d'action de la cytokine restent encore peu connus (Holstein, Menger et al. 2007) (Holstein, Orth et al. 2011).

## **(2) Facteurs environnementaux**

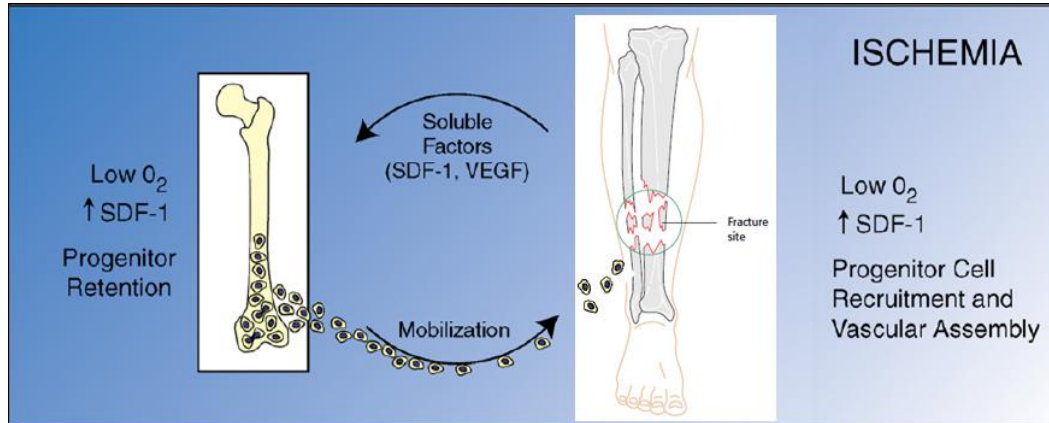
### **(a) Tension en oxygène**

La rupture de la vascularisation osseuse qui survient consécutivement à une fracture génère une hypoxie locale ou ischémie sur le site lésé. Si l'hypoxie temporaire après blessure est indispensable à l'initiation des mécanismes de réparation (angiogenèse, production de cytokines, ...), une hypoxie prolongée de type chronique est plutôt délétère à la réparation d'une lésion (Bishop 2008). Ainsi, plusieurs études ont montré un retard important dans la réparation de blessures osseuses présentant une mauvaise restauration de la vascularisation (Dickson, Katzman et al. 1995; Brinker and Bailey 1997).

Le dioxygène est un facteur clé essentiel à la réalisation de nombreux processus cellulaires de la réparation osseuse. Substrat indispensable au métabolisme aérobie, l'oxygène est nécessaire à l'activité d'un certain nombre d'enzymes intervenant à différentes étapes de la réparation de fractures, comme les hydroxylases, les oxygénases ou les cyclooxygénases. Zhang et al ont montré que l'absence de cyclooxygénase-2 chez les souris COX-2<sup>-/-</sup> altère la réparation osseuse en raison d'un défaut de la différenciation ostéoblastique (Zhang,

Schwarz et al. 2002). Le dioxygène est par ailleurs requis pour l'hydroxylation de certains résidus proline et lysine du protocollagène (Kivirikko and Prockop 1967), et intervient à ce titre dans la synthèse du collagène de la matrice extracellulaire au cours des phases de formation osseuse. Dans les blessures en réparation, les dérivés réactifs de l'oxygène (DRO ou Reactive Oxygen Species en anglais) tels que l'anion superoxyde  $O_2^-$  ou le peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$  agissent comme messagers cellulaires qui stimulent divers processus de la réparation (angiogenèse, motilité cellulaire,...) (Rodriguez, Felix et al. 2008). Hypoxie et hyperoxie augmentent toutes deux la production des dérivés réactifs de l'oxygène (Hohn, MacKay et al. 1976). Mais une augmentation consécutive des DRO bloque leurs effets bénéfiques et cause des dommages tissulaires importants (Rodriguez, Felix et al. 2008). De plus, comme souligné dans un chapitre précédent, la tension en oxygène participe activement à la maintenance des cellules souches/progéniteurs ostéocompétents de type mésenchymateux et hématopoïétiques. Enfin, de par son action régulant l'expression de la protéine **SDF-1 $\alpha$**  (Stromal Cells-Derived Factor-1 $\alpha$ ), la tension en oxygène est un facteur clé du contrôle du recrutement et de la mobilisation des cellules ostéoprogénitrices jusqu'au site de réparation (Kitaori, Hiromu et al. 2009). Au niveau de la moelle osseuse, la liaison de SDF-1 $\alpha$  à son récepteur CXCR4 (alpha chemokine receptor specific for stromal-derived-factor-1) est connue pour favoriser le « nichage » des CSH/PH, c'est-à-dire le maintien des cellules à l'état quiescent dans le microenvironnement médullaire spécifique. Dans les cellules endothéliales, l'expression du gène codant SDF-1 $\alpha$  est sous la dépendance du facteur HIF (Ceradini, Kulkarni et al. 2004). Lors d'une blessure, Ceradini et al ont démontré que le niveau d'expression de SDF-1 $\alpha$  dans la lésion ischémique est directement corrélé à l'amplitude de l'hypoxie (Ceradini and Geoffrey 2005). L'augmentation de l'expression de SDF-1 $\alpha$  induite par HIF est impliquée dans le recrutement et la mobilisation des progéniteurs pro-angiogéniques (Jin, Shido et al. 2006) des CSH/PH (Matsumoto, Atsuhiko et al. 2006) et des CSM (Otsuru, Tamai et al. 2008; Kitaori, Hiromu et al. 2009). Selon l'hypothèse de Ceradini, les tissus en cours de réparation, transitoirement hypoxiques, constituent une niche conditionnelle assurant le recrutement et la rétention de cellules progénitrices circulantes *via* la modulation du gradient SDF-1 par le facteur HIF (figure II-24) (Ceradini and Geoffrey 2005).





**Figure II-24 : Niche conditionnelle pour les cellules ostéogénitrices.**

Lorsqu'une fracture ou un défaut osseux survient (dessin de droite), la rupture de la vascularisation osseuse entraîne une ischémie locale ou hypoxie, qui déclenche l'expression de SDF-1 $\alpha$ . Un gradient de la cytokine s'installe, induisant le recrutement et la mobilisation des progéniteurs ostéocompétents en provenance de niches médullaires localisées dans d'autres pièces osseuses de l'organisme (dessin de gauche). Au cours de la réparation, la synthèse de cytokines et de facteurs de croissance (dont VEGF, SDF-1 $\alpha$ ,...) tend à amoindrir le gradient de SDF-1 au niveau de la lésion (Ceradini and Geoffrey 2005).

Les quelques exemples ci-dessus illustrent l'importance de la tension en oxygène au cours des processus de réparation osseuse. Ces observations ont ouvert la voie à plusieurs approches expérimentales visant à moduler la tension en oxygène (ou la signalisation cellulaire médiée par le dioxygène) pour favoriser les mécanismes de réparation osseuse. En 2008, le groupe de Clemens met au point un modèle murin présentant une délétion spécifique de la protéine Von Hippel-Lindau (VHL) dans les ostéoblastes (Wan, Gilbert et al. 2008). L'absence de ce facteur dans les cellules empêche la dégradation de HIF-1 $\alpha$ . Ce dernier s'accumule alors dans le noyau des ostéoblastes et s'associe avec HIF-1 $\beta$ , provoquant une activation constitutive de la voie de signalisation HIF. Soumises à un protocole d'ostéogenèse par distraction, les souris  $\Delta$ VHL présentent une augmentation de l'expression de la protéine VEGF et du marqueur endothélial CD31, ainsi qu'une néoformation osseuse supérieure à celle rencontrée chez les souris contrôle. Les auteurs concluent que l'activation de la voie de signalisation HIF accélère la régénération osseuse. A l'inverse, ils montrent dans la même publication que l'inactivation de la voie HIF nuit à la réparation (Wan, Gilbert et al. 2008). Trois ans plus tard, en 2011, la même équipe implante un biomatériau libérant un inhibiteur de la dégradation de HIF (le DFO, desferrioxamine) dans un modèle de défaut segmentaire chez le rat. Les résultats montrent une amélioration

importante de la vascularisation et de la réparation du défaut osseux (Stewart, Goldstein et al. 2011).

Compte tenu du pouvoir mobilisateur de l'hypoxie sur les cellules ostéoprogénitrices, une autre approche expérimentale consiste à placer l'animal entier dans un environnement pauvre en oxygène, afin de générer une hypoxie *in vivo* de type systémique. Deux types d'hypoxie *in vivo* sont envisageables en laboratoire :

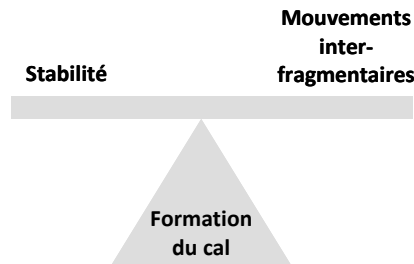
- L'**hypoxie hypobare**, dite d'altitude, dans laquelle la diminution de pression de l'air atmosphérique conduit à la diminution de la pression partielle de chacun des gaz qui le composent, dont le dioxygène. Chacun des gaz reste identique en proportion (l'air est toujours constitué de 21% d'O<sub>2</sub>), en revanche la fraction en dioxygène dans les gaz inspirés (FIO<sub>2</sub>) est diminuée.
- L'**hypoxie normobare**, dans laquelle la proportion en O<sub>2</sub> est diminuée dans le mélange gazeux respiré, par exemple par l'ajout d'un surplus d'azote à ce mélange gazeux.

Si l'importance de la tension en oxygène est maintenant largement admise par la communauté scientifique en recherche orthopédique, les effets modulateurs positifs ou négatifs du dioxygène sur les mécanismes de la réparation osseuse restent encore très débattus (Gidado, Khan et al. 2009).

### (b) Forces mécaniques

Comme déjà souligné dans le chapitre II-B-1-3, le tissu osseux est soumis à des contraintes mécaniques de tension, de compression, d'étirement et de cisaillement. Le microenvironnement et les contraintes mécaniques qui s'appliquent au niveau d'une zone de lésion osseuse conditionnent le processus de réparation (Epari, Taylor et al. 2006; Shapiro 2008).

De fait, la stabilisation ou non-stabilisation des fragments osseux générés par la fracture va conditionner le mode de réparation de cette dernière. Le niveau de formation du cal osseux dépend d'un équilibre optimal entre la stabilité de la fracture et les micro-mouvements inter-fragmentaires (figure II-25) (Wraighte and Scammell 2007)



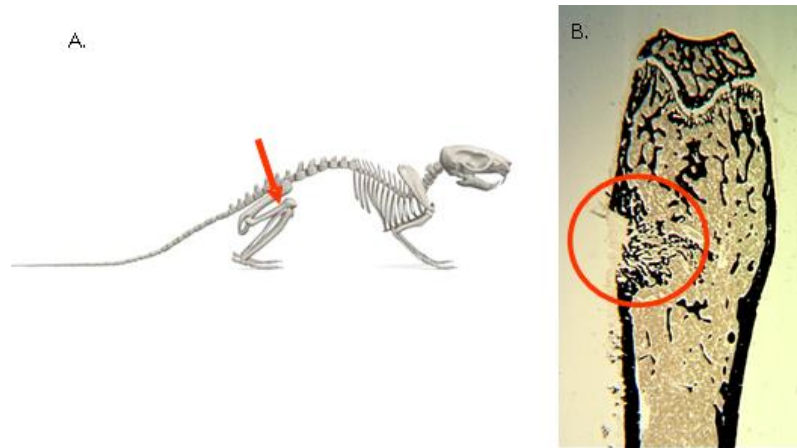
**Figure II-25 : Forces mécaniques et réparation osseuse.**

La formation du cal repose sur un subtil équilibre entre la stabilisation des fragments osseux et les mouvements des fragments osseux les uns par rapport aux autres.

- Dans les fractures non stabilisées, les mouvements inter-fragmentaires créent un environnement mécanique orientant la réparation vers un mode d'ossification endochondrale.
- Une stabilisation stricte de la fracture oriente vers un processus de réparation osseuse par ossification intramembranaire.

En fonction du traitement chirurgical appliqué, le chirurgien orthopédiste peut préférentiellement orienter les mécanismes de réparation vers l'une ou l'autre des voies. Par exemple, un traitement par vissage ou par plaques auto-compressives permettra d'atteindre un plus haut degré de stabilité que la pose d'un fixateur externe ou d'un brochage intramédullaire (Colton, Dell'Oca et al. 2000).

Le modèle de défaut osseux développé et utilisé au cours de ce travail de thèse est un défaut cavitaire ( $1 \text{ mm}^2$ ) réalisé dans la métaphyse de la partie distale du fémur droit de souris.



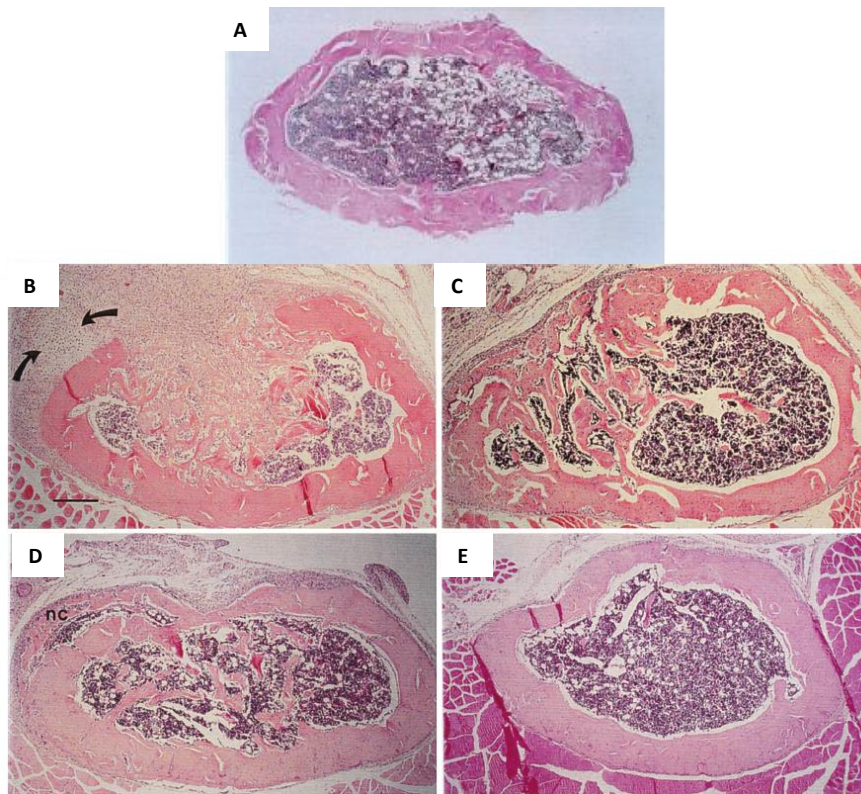
**Figure II-26 : Modèle de défaut osseux cavitaire métaphysaire.**

- A. Localisation du défaut osseux sur le squelette de souris. Le trou est réalisé dans le fémur postérieur droit de l'animal, au niveau de la partie distale.
- B. Coupe longitudinale de fémur opéré (contrasté au Von Kossa). Le cercle rouge entoure la zone de défaut, réalisée dans la métaphyse secondaire.

(Source : données personnelles)

Dans ce type de modèle, l'os cortical et l'os trabéculaire de la métaphyse secondaire sont tous les deux lésés. Une cinétique de réparation de ce type de défaut cortico-trabéculaire a été menée par une équipe finlandaise en 2001 (Uusitalo, Rantakokko et al. 2001, photographie II-3).

A J<sub>7</sub> (photographie II-3B), la cavité médullaire dans la zone lésée est remplie d'os réticulaire immature, tandis que l'os cortical et le périoste sont envahis par un tissu de granulation mou. Les auteurs précisent que des petites zones cartilagineuses sont parfois observées en périphérie de la lésion (figure photographie II-3B, flèches noires), mais jamais à l'intérieur de la cavité médullaire. A J<sub>14</sub> (II-3C), de l'os trabéculaire est formé à l'intérieur de la lésion. Au vingt-et-unième jour (II-3D), un pont osseux relie les deux bouts d'os cortical. Ce dernier est complètement réuni au quarante-deuxième jour post-opératoire (II-3E). Compte tenu de l'absence de cartilage à l'intérieur de la lésion au cours de la cinétique de réparation, les auteurs confirment les conclusions de précédentes études stipulant que les lésions cortico-trabéculaires se réparent par **ossification intramembranaire** (Uthoff and Rahn 1981) (Charnley and Baker 1952)



**Photographie II-3 : Réparation d'un défaut cortico-trabéculaire dans l'os métaphysaire.**

(Uusitalo, Rantakokko et al. 2001). Coupes transversales de fémur inclus en paraffine, après coloration à l'hématoxyline-éosine.

- A. Histologie avant la réalisation du défaut osseux
- B. Histologie à J<sub>7</sub> post-opératoire. La zone cartilagineuse est délimitée par les flèches noires.
- C. Histologie à J<sub>14</sub> post-opératoire
- D. Histologie à J<sub>21</sub> post-opératoire
- E. Histologie à J<sub>42</sub> post-opératoire

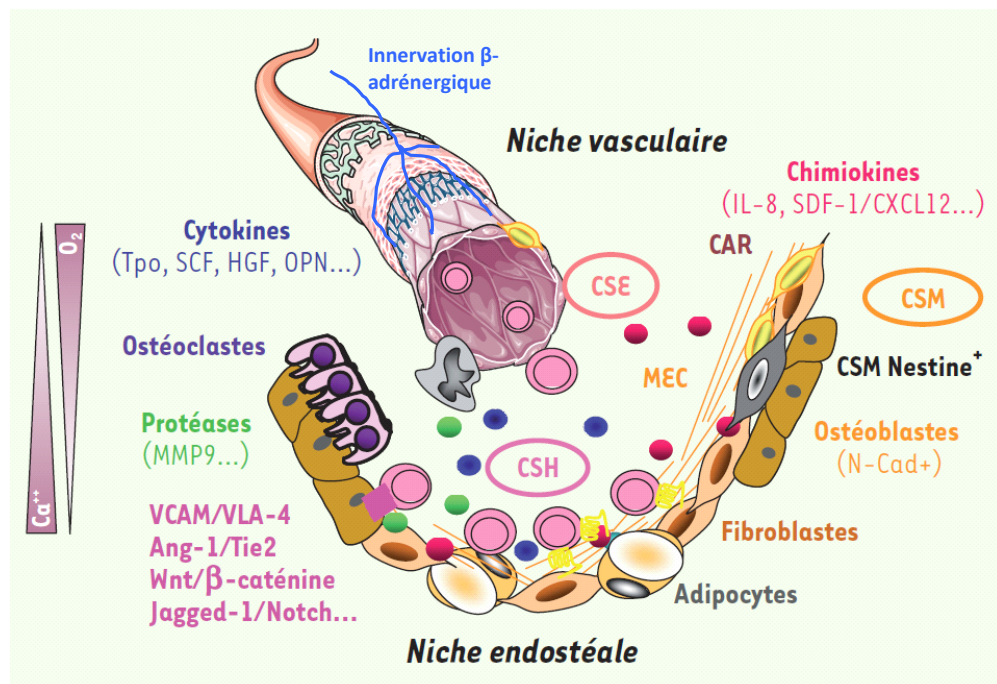
### 3. Concept de niches hématopoïétiques médullaires et interactions cellulaires au sein des niches

#### a) Définition des niches hématopoïétiques médullaires

La notion de niche à cellules souches hématopoïétiques a été conceptualisée pour la première fois en 1978 par Schofield (Schofield 1978). La niche se définit aujourd'hui comme un microenvironnement particulier de la moelle osseuse qui contrôle le nombre, la quiescence, l'auto-renouvellement, la prolifération, la différenciation et la localisation des

CSH. Il s'agit donc d'une entité spatio-temporelle dynamique au sein de laquelle des événements de communications intercellulaires doivent se produire au bon endroit et au bon moment pour contrôler le destin des CSH.

Bien que controversées, les connaissances actuelles font état de l'existence de deux ou trois types de niches hématopoïétiques : une **niche endostéale**, une **niche vasculaire** et une niche **mésenchymateuse** (Yin and Li 2006) (Mendez-Ferrer, Michurina et al. 2010).



**Figure II-27 : Représentation schématique des niches hématopoïétiques médullaires et de leurs constituants cellulaires et moléculaires.**

(Lataillade, Brunet de la Grange et al. 2010)

Abréviations : CSH : cellule souche hématopoïétique ; CSE : cellule souche endothéliale ; CSM : cellule souche mésenchymateuse ; MEC : matrice extracellulaire ; CAR : CXCL12 abondant reticular cells ; N-Cad : N-Cadhérine<sup>+</sup> ; MMP-9 : membrane metalloproteinase-9 ; Ca : calcium ; O<sub>2</sub> : dioxygène

## b) Les différentes niches

La niche endostéale, au contact de l'os, serait impliquée dans le maintien en quiescence des cellules souches. Elle est majoritairement composée d'ostéoblastes et d'ostéoclastes, ainsi que de fibroblastes et d'adipocytes (Wasnik, Tiwari et al. 2012).

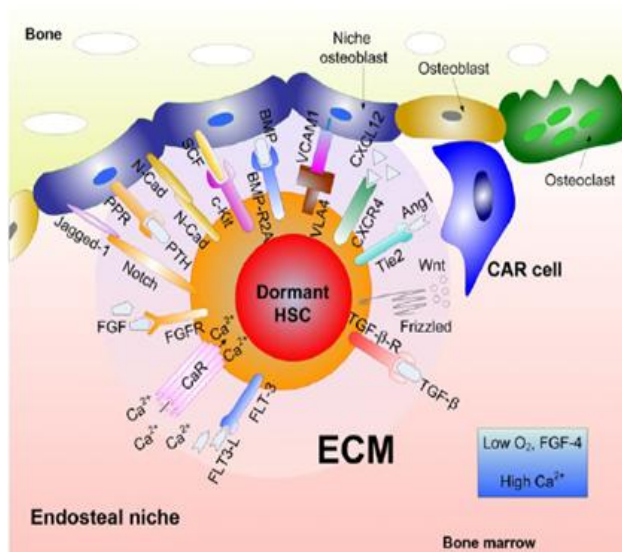
La niche vasculaire se compose d'un réseau de vaisseaux fenêtrés formés par des cellules endothéliales, qui dérivent des cellules souches endothéliales. Elle participe plutôt à la prolifération et à la différenciation des CSH (Kaplan, Psaila et al. 2007; Wasnik, Tiwari et al. 2012).

Le domaine de la recherche sur les niches à cellules souches hématopoïétiques est particulièrement actif et les connaissances actuelles restent débattues. Ainsi, l'identification récente d'une sous-population spécifique de CSM Nestine<sup>+</sup> jouant un rôle dans la mobilisation des CSH (cf paragraphe ci-dessous) soulève l'existence d'une troisième niche potentielle, dite **mésenchymateuse**, impliquée dans le contrôle des CSH/PH. L'idée d'un possible **continuum entre niches** plutôt que l'existence de deux/trois niches distinctes est aussi discutée (Mendez-Ferrer, Michurina et al. 2010).

### ***(1) Niche endostéale***

Éléments en faveur de l'existence de la niche endostéale : Yahata et al a montré que des CSH/PH CD34<sup>+</sup> humaines transplantées chez la souris se logent dans la région endostéale des tibias murins, et que ces cellules, à l'état quiescent, interagissent avec des composants du microenvironnement local (Yahata, Muguruma et al. 2008). L'année suivante, la mise en œuvre de technologies d'imagerie en temps-réel permettant de suivre le cheminement de CSH/PH GFP<sup>+</sup> transplantées ont montré un « nichage » préférentiel de ces cellules dans la région endostéale des os trabéculaires (Xie, Yin et al. 2009).

La niche endostéale, parfois appelée ostéoblastique, serait impliquée dans le maintien à l'état quiescent des CSH/PH (Arai and Suda 2007), en fournissant les facteurs environnementaux et les molécules d'adhésion nécessaires à l'inhibition de la différenciation hématopoïétique (Hosokawa, Arai et al. 2010). Les principaux facteurs impliqués sont cités dans la figure suivante.



▪ **Ligands sécrétés et leurs récepteurs**

Intéactions Angiopoietin-Tie2 (Arai, Hirao et al. 2004)  
 Thrombopoietin, Mpl receptor (Yoshihara, Arai et al. 2007)  
 Stem cell factor (SCF), c-kit receptor (Barker 1997)  
 Stromal-derived factor (SDF-1/CXCL12), CXCR4 (Sugiyama, Kohara et al. 2006)  
 Transforming growth factor beta (TGF-β), TGF-β R (Yamazaki, Iwama, 2009)  
 Fibroblast growth factor (FGF), FGFR1-4 (Rizo, Vellenga et al. 2006)  
 Parathyroid hormone (Garrett and Emerson 2008)

▪ **Voies de signalisation**

Voie canonique Wnt-frizzled (Malhotra and Kincade 2009)  
 Voie Notch (Zhou, Huang et al. 2010)  
 Voie Jak-Stat (Ward, Touw et al. 2000)  
 Voie Hedgehog (Hh) (Hofmann, Stover et al. 2009)  
 Voie Bone morphogenic protein (BMP) (Zhang, Niu et al. 2003)

▪ **Molécules d'adhésion**

VLA-4 (Taichman and Emerson 1998)  
 VCAM-1 (Tanaka, Morimoto et al. 1995)  
 N-cadherin (Hosokawa, Arai et al. 2010)

▪ **Gradients physico-chimiques**

HIF-1/O<sub>2</sub> gradient (Takubo, Goda et al. 2010)  
 Ions Ca<sup>2+</sup>, calcium-sensing receptor (Adams, Chabner et al. 2006)

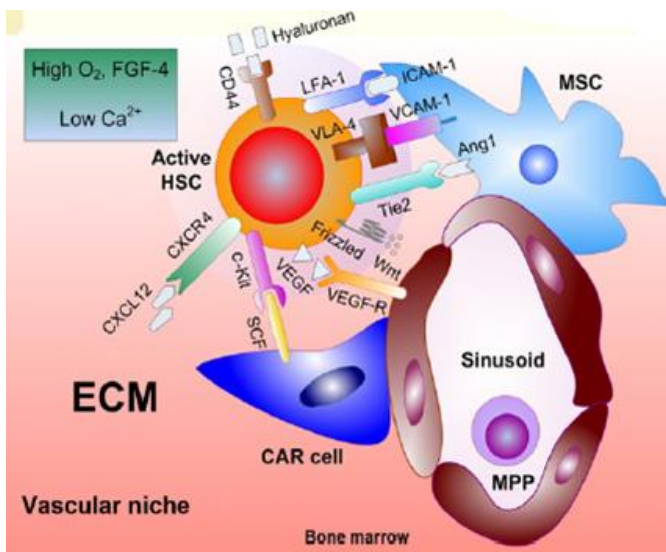
**Figure II-28 : Représentation schématique et tableau des principales interactions moléculaires, voies de signalisation et facteurs physico-chimiques impliqués dans la régulation de la niche endostéale.**  
 (d'après (Wasnik, Tiwari et al. 2012)).

**(2) Niche vasculaire**

Éléments en faveur de l'existence de la niche vasculaire : L'observation selon laquelle les CSH/PH s'auto-renouvellent et se différencient au cours du développement foetal, à un stade précédant la mise en place des cavités de la moelle osseuse, a longtemps laissé supposer qu'il existait une autre niche, non ostéoblastique, capable de réguler le devenir des progéniteurs hématopoïétiques. Des études *in vitro* réalisées au début des années 2000 ont montré que les cellules endothéliales pouvaient participer à la maintenance des CSH/PH. Une expérience de Yao, notamment, fait état d'une diminution du nombre de CSH/PH suite à la délétion de gp130, une glycoprotéine de la famille du récepteur à l'IL-6 exprimée à la membrane des cellules endothéliales (Yao, Yokota et al. 2005). Ultérieurement, des techniques d'imagerie ont permis d'observer la présence de CSH/PH à distance de l'endoste, au niveau des sinusoides médullaires (Oh and Kwon 2010), fournissant de nouveaux éléments en faveur de l'existence d'une niche de type vasculaire.



La niche vasculaire, plus oxygénée que la niche endostéale, serait plutôt impliquée dans le recrutement des CSH/PH, notamment grâce à la production des chimio-attractants FGF-4 et SDF-1 par les cellules endothéliales (Avecilla, Hattori et al. 2004; Kopp, Avecilla et al. 2005) (figure II-29). Morrison et al ont montré que 60% des CSH/PH positives pour le marqueur CD150<sup>+</sup> sont localisées à proximité des sinusoides médullaires, contre seulement 20% à proximité de l'endoste (Kiel, Yilmaz et al. 2005).



▪ **Ligands sécrétés et leurs récepteurs**

VEGF-VEGF receptor (Doan and Chute 2012)  
 Ang1-Tie2 receptor (Kopp, Avecilla et al. 2005)  
 Fibroblast growth Factor (FGF), FGFR1-4 (Avecilla, Hattori et al. 2004)  
 Voie SDF-1-CXCR4 (Yun and Jo 2003)

▪ **Voies de signalisation**

Voie Notch (Zhou, Huang et al. 2010)  
 Voie canonique Wnt-frizzled (Malhotra and Kincade 2009)

▪ **Cytokines et facteurs de croissance**

M-CSF, G-CSF, GM-CSF, TGF-b, BMP-2A, FGF, IL-6, IL-11, IL-13, et IFN-g (Li, Huang et al. 2000)

▪ **Molécules d'adhésion**

PECAM (Ross, Freeman et al. 2008)  
 VCAM-1 et ICAM (van Buul, Voermans et al. 2002)  
 VE-cadherin (Avecilla, Hattori et al. 2004)

▪ **Gradients physico-chimiques**

HIF-1/O<sub>2</sub> gradient (Takubo, Goda et al. 2010)

**Figure II-29 : Représentation schématique et tableau des principales interactions moléculaires, voies de signalisation et facteurs physico-chimiques impliquées dans la régulation de la niche vasculaire.**

(d'après (Wasnik, Tiwari et al. 2012)).

### (3) Niche mésenchymateuse

Éléments en faveur de l'existence de la niche mésenchymateuse : La notion de niche mésenchymateuse est une notion récente, qui a émergé avec les travaux de Mendez-Ferrer en 2010. Cette équipe a montré qu'une population de cellules d'origine mésenchymateuse et positives pour la Nestine<sup>+</sup> est impliquée dans la régulation des CSH/PH. En effet, il semblerait que les CSH injectées dans une souris receveuse irradiée létalement se nichent à proximité des CSM Nestine<sup>+</sup>. De plus, une déplétion *in vivo* en cellules Nestine<sup>+</sup> réduit considérablement le nichage des CSH/PH dans la moelle osseuse (Mendez-Ferrer, Michurina et al. 2010). L'identité des cellules Nestine<sup>+</sup> est toujours débattue, elles seraient capables de se différencier en ostéoblastes et en adipocytes (Mendez-Ferrer, Michurina et al. 2010). Les

cellules CAR et les cellules LepR+ pourrait faire partie de la niche mésenchymateuse (Omatsu, Sugiyama et al. 2010)

### **c) Composants cellulaires des niches hématopoïétiques médullaires**

#### ***(1) Cellules stromales mésenchymateuses positives pour la Nestine***

Identifiées par Mendez-Ferrer en 2010, il s'agit d'une population spécifique de CSM exprimant la nestine, protéine des filaments intermédiaires (Mendez-Ferrer, Michurina et al. 2010). Les CSM Nestine<sup>+</sup> sont localisées à proximité des CSH, au niveau de zones périvasculaires centro-médullaires. Elles se retrouvent aussi près de l'endoste, mais en bien plus faible proportion, et établissent des contacts avec les fibres nerveuses adrénérgiques intervenant dans la mobilisation des CSH (Katayama, Battista et al. 2006). Les CSM Nestine<sup>+</sup> expriment abondamment différents types de transcrits impliqués dans la maintenance des CSH, comme SDF-1, SCF (Stem Cell Factor), angiopoïétine-1 (Ang-1) ou bien encore l'ostéopontine (Mendez-Ferrer, Michurina et al. 2010). La déplétion des cellules Nestine<sup>+</sup> cause la mobilisation de près de la moitié du pool de CSH médullaires en direction de la rate (Mendez-Ferrer, Michurina et al. 2010).

#### ***(2) Cellules de la lignée ostéoblastique***

Au-delà de leur rôle fondamental dans l'homéostasie du tissu osseux, les cellules ostéoblastiques d'origine mésenchymateuse sont des composants clés des niches hématopoïétiques. Deux études publiées en 2003 ont montré que les cellules ostéoblastiques régulent le nombre de CSH *in vivo*. Dans une première étude, l'équipe de Calvi a montré que des souris transgéniques pourvues d'ostéoblastes qui expriment de façon constitutive le récepteur de la parathormone (PTH) possèdent un plus grand pool médullaire de CSH/PH (Calvi, Adams et al. 2003). Une seconde étude a démontré que des souris présentant une inactivation conditionnelle du récepteur BMPreceptor IA ont une augmentation concomitante de leur nombre d'ostéoblastes et de CSH/PH (Visnjic, Kalajzic et al. 2004). A l'inverse, une diminution des cellules ostéoblastiques par un traitement au ganciclovir génère une perte osseuse qui s'accompagne d'une diminution progressive de la

cellularité médullaire, avec perte des progéniteurs érythroïdes, lymphoïdes et myéloïdes. L'arrêt du traitement ganciclovir permet la reconstitution d'un pool ostéoblastique et le retour d'une hématopoïèse médullaire, confirmant ainsi l'existence d'un dialogue entre cellules mésenchymateuses et hématopoïétiques au sein de la moelle osseuse (Visnjic, Kalajzic et al. 2004).

### **(3) Cellules CAR (CXCL-12-Abundant Reticular Cells)**

Des analyses immuno-histochimiques ont permis de mettre en évidence l'existence d'une petite population de cellules réticulaires exprimant très fortement la chimiokine SDF-1 (aussi nommée CXCL-12). Uniformément dispersées dans la moelle osseuse, ces cellules, qui sont reliées entre elles, forment un réseau autour des cellules endothéliales sinusoides et sont en contact étroit avec les progéniteurs hématopoïétiques (Sugiyama, Kohara et al. 2006). La déplétion des cellules CAR chez la souris entraîne une diminution du nombre de CSH/PH et mène à une diminution des progéniteurs lympho-érythrocytaires (Omatsu, Sugiyama et al. 2010). Les cellules CAR sont des progéniteurs mésenchymateux qui ont le potentiel de se différencier en adipocytes et en ostéoblastes (Omatsu, Sugiyama et al. 2010). Ces cellules seraient essentielles à la prolifération des progéniteurs lymphoïdes et érythrocytaires et au maintien des CSH/PH dans un état indifférencié, mais leurs rôles au sein des niches hématopoïétiques méritent d'être approfondis.

### **(4) Adipocytes**

Un rôle de régulateur négatif de l'hématopoïèse a été attribué aux adipocytes. Ainsi, dans une étude de 2009, des modèles murins pharmacologiques et génétiques ont permis de démontrer que la délétion des adipocytes accélère la prise de greffe des CSH/PH transplantées (Naveiras, Nardi et al. 2009).

### **(5) Ostéoclastes**

Le rôle des ostéoclastes dans le contrôle des CSH reste controversé. En augmentant l'activité des cellules ostéoclastiques par l'injection de RANK-L, Kollet a montré une augmentation de la mobilisation des progéniteurs hématopoïétiques (Kollet, Dar et al. 2006). A l'inverse, une étude plus récente de Winkler consistant à inhiber l'activité ostéoclastique par un traitement

au zoledronate suggère que la mobilisation des progéniteurs hématopoïétiques en réponse au G-CSF n'est pas directement gouvernée par les ostéoclastes (Winkler, Sims et al. 2010).

### ***(6) Cellules de Schwann en relation avec le système nerveux sympathique***

Une étude du laboratoire de P. Frenette a mis en évidence le rôle des rythmes circadiens, en lien avec des variations des concentrations médullaires de SDF-1, dans la mobilisation des CSH/PH de la moelle vers la circulation sanguine périphérique (Mendez-Ferrer, Lucas et al. 2008). La sécrétion de SDF-1 par les cellules du microenvironnement médullaire est coordonnée avec la sécrétion circadienne de noradrénaline. Cette dernière, en se fixant sur ses récepteurs  $\beta$ -adrénergiques des cellules stromales, induit la sortie de la moelle des CSH/PH pendant les périodes de repos chez les mammifères. Par ailleurs, il a récemment été montré que les cellules de Schwann non myélinisantes qui gaignent les fibres du système nerveux sympathique établissent un contact étroit avec les CSH de la moelle. Les cellules de Schwann participeraient à la régulation du pool de CSH en sécrétant des facteurs destinés à activer le TGF- $\beta$ , régulateur négatif des CSH (Yamazaki, Ema et al. 2011).

### ***(7) Cellules endothéliales en association avec les cellules stromales périvasculaires exprimant le récepteur à la leptine (LepR+)***

La moelle osseuse est extrêmement vascularisée. Les capillaires sinusoïdes médullaires, formés d'une seule couche de cellules endothéliales disjointes, interviennent dans la constitution des niches vasculaires qui participent à la régulation des CSH/PH. Par exemple, l'administration d'un anticorps anti-VE cadhérine altère l'hématopoïèse en entraînant une diminution de la différenciation mégacaryocytaire (Li, Johnson et al. 2004). Récemment, une sous-population de cellules stromales périvasculaires qui expriment le récepteur à la leptine a été identifiée comme un nouvel acteur cellulaire des niches (Ding, Saunders et al. 2012). L'équipe de Morrison a montré que la délétion conditionnelle du gène *Kitl* codant pour le ligand du récepteur à activité tyrosine kinase c-Kit dans les ostéoblastes et ostéoprogéniteurs n'a que peu d'effet sur les CSH/PH. En revanche, la délétion de ce même gène dans les cellules endothéliales et les progéniteurs mésenchymateux périvasculaires

réduit fortement le nombre de CSH/PH présentes dans la moelle osseuse (Ding, Saunders et al. 2012).

### ***(8) Macrophages et ostéomacs***

Les macrophages ont récemment été identifiés comme des composants importants de la niche impliqués dans la maintenance et la rétention des CSH. Ainsi, l'induction de l'apoptose de macrophages médullaires dans un modèle de souris transgénique s'accompagne d'une diminution du nombre d'ostéoblastes endostéaux, suivie d'une mobilisation des CSH dans le sang (Winkler, Sims et al. 2010). L'importance de ces cellules dans la régulation de la niche a été confirmée ultérieurement par Chow qui a identifié les macrophages comme des régulateurs positifs des CSM Nestin<sup>+</sup> (Chow, Lucas et al. 2011). Les mécanismes de régulation sous-jacents sont pour l'heure inconnus.

### ***(9) Ostéocytes***

Très récemment, il a été démontré que des signaux générés par les ostéocytes contribuent à la régulation de l'hématopoïèse (Fulzele, Krause et al. 2013). Les ostéocytes expriment plusieurs types de récepteurs couplés aux protéines G, tels que les récepteurs de la PTH (Powell, Barry et al. 2011) et des prostaglandines (Cherian, Cheng et al. 2003). Dans un modèle de souris transgéniques, Fulzele et collègues ont montré que la délétion conditionnelle d'une sous-unité constitutionnelle des récepteurs couplés aux protéines G (sous-unité GαS) génère un syndrome myélo-prolifératif. Les auteurs ont montré que ce phénotype trouve son origine dans un dérèglement du microenvironnement médullaire car des souris transgéniques porteuses de la délétion GαS ostéocytaire recevant une greffe de moelle osseuse développent très rapidement le syndrome myélo-prolifératif.

Des études supplémentaires sont nécessaires pour mieux comprendre quel est le rôle joué par les ostéocytes dans le contrôle de la niche hématopoïétique.

## **d) Coopération entre niches**

Niches endostéale et vasculaire possèdent des composants cellulaires et moléculaires en commun ce qui suggère, outre l'existence d'interactions fortes, un possible partage des activités fonctionnelles entre les deux niches (Sugiyama, Kohara et al. 2006). Ainsi, les cellules endothéliales, composants majoritaires de la niche vasculaire, se retrouvent dans

l'ensemble de la moelle osseuse. Dans la région endostéale, elles s'avèrent importantes pour les mécanismes d'angiogenèse et d'ostéogenèse (Nakamura, Arai et al. 2010; Guerrouahen, Al-Hijji et al. 2011). D'un point de vue moléculaire, l'axe SDF-1/CXCR-4, fondamental pour la maintenance, le trafic et la prolifération des CSH/PH, est présent à la fois dans la niche endostéale et dans la niche vasculaire. Au cours de la mobilisation, il promeut l'entrée en cycle des CSH, leur recrutement vers la niche vasculaire et leur différenciation (Lataillade, Clay et al. 2000) (Lataillade, Clay et al. 2002). La régulation des CSH/PH par la signalisation Notch et la voie Ang1 tient place dans les deux niches (Zhou, Huang et al. 2010). Enfin, les études du groupe de Jung ont montré que l'Annexine II est exprimée par les ostéoblastes et les cellules endothéliales. Si l'adhésion des CSH/PH aux ostéoblastes *via* l'annexine II est connue, l'interaction avec les cellules endothéliales reste encore à étudier (Jung, Wang et al. 2007).

De telles observations incitent la communauté scientifique à redéfinir et affiner la notion actuelle de niche hématopoïétique. Il est probable que niche vasculaire et niche ostéoblastique ne soient pas aussi distinctes que ce qui était originellement perçu (Krause, Scadden et al. 2013).

### **e) Les cellules hématopoïétiques modulent leurs niches**

La notion de **réciprocité** dans les interactions entre niche(s) médullaire(s) et cellules hématopoïétiques est relativement récente (Krause, Scadden et al. 2013). Plusieurs études suggèrent que les cellules de la lignée hématopoïétique sont impliquées dans la formation osseuse et la maintenance des activités cellulaires au sein de la niche. L'équipe de Taichman a pu montrer chez la souris qu'un stress hématopoïétique généré par saignée induit la sécrétion de BMP-2 et BMP-6 par les CSH/PH, ce qui oriente la différenciation des CSM vers la lignée ostéoblastique *in vivo* et *in vitro*. Chez des animaux âgés et ostéoporotiques, la synthèse des BMPs par les CSH/PH est amoindrie (Jung, Song et al. 2008). De même, les mégacaryocytes localisés à proximité de l'endoste sont capables de stimuler la différenciation ostéoblastique par la synthèse de BMP-2, -4 et -6 (Kacena, Gundberg et al. 2006; Garimella, Kacena et al. 2007). Plus récemment, il a été montré que les lymphocytes T régulateurs protègent des CSH allogéniques transplantées dans la niche et permettent leur persistance sur de longues périodes, même sans traitement immunosuppresseur du receveur (Fujisaki, Wu et al. 2011).

## Objectifs

La réparation des grandes pertes de substance osseuse nécessite le recrutement constant de progéniteurs ostéocompétents de nature hématopoïétique et mésenchymateuse. Une stratégie pour améliorer la réparation pourrait être de mobiliser massivement ces progéniteurs sur le site lésé (Kumar and Ponnazhagan 2012; Miller and Kaplan 2012). De nombreux facteurs environnementaux modulent la mobilisation des progéniteurs ostéocompétents. Chez les animaux non opérés, les données de la littérature montrent que la diminution *in vivo* de la tension en O<sub>2</sub> (hypoxie respiratoire hypobare) pourrait être un facteur environnemental capable d'induire la mobilisation de ces cellules (Rocheffort, Bruno et al. 2006).

En clinique humaine, la contention du membre accidenté est indispensable à la réparation car elle favorise la formation du cal osseux tout en évitant la pseudarthrose. Or, la stabilisation d'un membre s'accompagne d'une diminution des contraintes mécaniques. Chez des animaux non opérés, cette diminution altère le remodelage osseux et entraîne une perte osseuse consécutive à une baisse des cellules ostéoprogénitrices. Compte tenu de cette observation, la moindre disponibilité des progéniteurs pourrait être potentiellement défavorable aux mécanismes de réparation. Toutefois, peu d'études se sont intéressées aux effets de la stabilisation du membre lésé sur la réparation osseuse. En laboratoire, le modèle d'hypodynamie par suspension permet de reproduire l'absence de contraintes mécaniques sur les membres postérieurs des animaux

***L'objectif de cette thèse a consisté à étudier l'effet croisé de l'hypoxie respiratoire et de la suspension hypodynamique sur les progéniteurs médullaires ostéocompétents chez des souris porteuses ou non d'un défaut osseux cavitaire fémoral.***

Les principales étapes de ce travail ont été définies comme suit :

- Mise au point des modèles d'hypoxie respiratoire et d'hypodynamie par suspension caudale chez la souris et validation de ces deux modèles expérimentaux.
- Etude des effets croisés de l'hypoxie respiratoire et de l'hypodynamie sur la régulation des progéniteurs ostéocompétents mésenchymateux et

hématopoïétiques : étude de la disponibilité des progéniteurs ostéocompétents et de leur redistribution tissulaire chez des souris non porteuses d'un défaut osseux.

- Etude des effets croisés de l'hypoxie respiratoire et de l'hypodynamie dans le cadre de la réparation osseuse, chez des souris porteuses d'un défaut osseux fémoral.

Ce travail a donné lieu à la rédaction d'un article scientifique, soumis dans la revue *Stem Cells Translational Medicine*. Un second article est actuellement en cours d'élaboration.

Le présent manuscrit propose tout d'abord un rappel bibliographique détaillé visant à montrer la **complexité** et le **dynamisme** du système osseux. Seront ensuite exposés les **résultats** du projet, articulés autour des étapes citées ci-dessus. Une **discussion** des données sera proposée, et sera suivie d'un chapitre sur les **perspectives** du travail.



### **III. Matériel et Méthodes**

#### ***A. Modèles animaux et protocoles expérimentaux***

##### **1. Animaux**

L'ensemble des expériences a été mené sur des souris mâles de souche C57Bl/6J (élevage Janvier). Réceptionnés à l'âge de 8 semaines, les animaux sont placés en stabulation pendant une semaine (phase d'acclimatation) avant leur intégration dans un protocole expérimental (cf paragraphe V.B). L'hébergement, dans des armoires d'animalerie, se fait selon les conditions standards suivantes : température  $21 \pm 1^\circ\text{C}$ , cycle de lumière 12h/12h non inversé et hygrométrie 45 à 60 %. Eau et nourriture sont fournies *ad libitum*. Dans le cadre des protocoles expérimentaux « caisson + suspension », les souris sont sacrifiées à l'âge de 10 semaines (22 g en moyenne). Dans les protocoles « opération + caisson + suspension », les souris sont opérées d'un défaut osseux cavitaire fémoral dans leur 9<sup>ème</sup> semaine, puis sacrifiées 11 jours après l'intervention, à l'âge de 10 semaines et demi. Toutes les expériences ont été menées après accord du comité d'éthique animale de l'IRBA.

##### **2. Modèle de suspension hypodynamique**

Afin d'induire une diminution *in vivo* de la quantité de cellules ostéoblastiques des pattes postérieures, nous avons placé des souris en suspension hypodynamique pendant 7 jours. Les autres stratégies visant à induire une diminution du pool des cellules ostéoblastiques se retrouvent dans la littérature, mais elles reposent toutes, à notre connaissance, sur l'emploi de souris transgéniques.

La suspension des animaux se déroule selon la méthode du laboratoire (Holy and Zerath 1996) dans des cages spécialisées en plexiglas (l=20 cm, p=40 cm, h=60 cm) avec fond inox troué. Ces cages ont initialement été développées pour le modèle rat. Avant de débiter les expériences employant des souris, une étape d'adaptation des cages à la petite taille de ces animaux a été nécessaire. Il a donc été indispensable de repenser l'appareillage utilisé (coupelles et tiges de suspension). Des coupelles de suspension en plexiglas ont notamment été fabriquées dans les ateliers de l'IRBA.

Brièvement, les souris sont placées dans un tube à contention duquel la queue de l'animal

dépasse. La queue est d'abord nettoyée à l'aide d'un savon (hibiscrub, dilué au 1/10) puis rincée à l'eau tiède. De l'éthanol 70% est ensuite appliqué à l'aide d'une compresse, puis le séchage de la queue est finalisé à l'aide d'un sèche-cheveux (sélection de l'allure de chauffe la plus basse). La queue est ensuite aspergée d'éther diéthylique afin d'être dégraissée puis séchée à nouveau, avant l'application de collodion 4%. Une fois le collodion sec, du sparadrap (80 cm environ) est enroulé tout le long de la queue et utilisé afin de fixer la coupelle et la tige à suspension. Ainsi appareillé, l'animal est replacé délicatement dans sa cage où il est suspendu, de sorte que les pattes postérieures ne touchent pas le sol grillagé.



**Photographie III-1 : Souris suspendue.**  
(Source : photographie personnelle).

### 3. Modèle d'hypoxie hypobare

L'épisode hypoxique a été généré en plaçant les animaux dans un caisson hypoxique hypobarique (Servathin). Il s'agit d'une grande enceinte de 21.8 m<sup>3</sup> implantée dans le hall d'essai de l'ancien bâtiment IRBA qui permet de créer une hypobarie expérimentale.



**Photographie III-2 : Caisson hypobare de l'IRBA.**  
(Source : photographie personnelle).

Ce modèle d'hypoxie en caisson a été préféré à d'autres moyens tels que les ligatures vasculaires, l'utilisation de phénylhydrazine, l'intoxication au monoxyde de carbone, *etc.*, car il n'impose pas de chirurgie invasive ou de voie médicamenteuse. La durée de l'épisode hypoxique a été choisie d'après des expériences préliminaires menées dans le laboratoire. Une cinétique à trois points (2, 4 et 9 jours d'épisode hypoxique) avait permis de montrer que le pic de la déplétion des progéniteurs hématopoïétiques dans la moelle osseuse était observé à 4 jours d'hypoxie. C'est donc cette durée qui a été sélectionnée en vue de nos expériences.

La valeur de la pression atmosphérique appliquée (50 kPa) a, quant à elle, été choisie d'après les données de Huff (Huff, Kaufman et al. 1975). Il s'agit de la valeur de pression la plus basse conduisant à la privation d'oxygène la plus forte sans être létale pour les animaux. Cette pression correspond à une altitude simulée de 5500 mètres environ et une  $FiO_2$  de 10%.

De façon pratique, une étape d'habituation à l'environnement du caisson est réalisée la semaine précédant l'épisode hypoxique. A cette occasion, les animaux sont transportés jusqu'au hall d'essai puis hébergés pendant une heure à l'intérieur du caisson, pompes allumées, portes fermées et vannes ouvertes afin de ne pas créer la dépression. A la fin de l'habituation, les animaux sont ramenés dans l'animalerie en attendant la date de début de l'épisode hypoxique.

L'épisode hypoxique se compose de trois phases :

- La décompression ou « montée en altitude » permettant d'atteindre le plateau de 50 kPa.
- Le plateau (50 kPa) maintenu pendant 4 jours
- Le retour à une pression atmosphérique de 1013 kPa ou « descente en altitude ».

#### La décompression :

La mise en dépression du caisson est initiée par la mise en route des pompes à vide (Leybold Sogevac SV585), concomitante à fermeture des vannes « cassage vide » et « aspiration ». La vitesse ascensionnelle, réglée par commande manuelle, est fixée à 1 ou 2 m/seconde, d'après les recommandations de Huff.

#### Le plateau :

Atteint au bout de 1h30-2h00 d'ascension, le plateau est maintenu pendant quatre jours consécutifs.

Le retour à la pression atmosphérique (1013 hPa) :

Se fait par l'ouverture progressive des pompes afin de casser le vide

La vitesse de descente est égale à 2 m/seconde (commande automatique, en accord avec les recommandations de Huff). Les animaux sont sacrifiés immédiatement à leur sortie du caisson.

Pression et altimétrie étaient mesurées pendant toute la durée de l'épisode hypoxique (à la fréquence d'acquisition de 1Hz pendant les phases de montée et de descente puis tous les 0,1 Hz lors du plateau). Une surveillance vidéo des souris était également mise en place, avec une caméra dirigée sur au moins une cage de chaque lot expérimental. La température, mesurée en continu en trois points différents du caisson, était contrôlée à 21°C.

#### **4. Modèle de défaut osseux cavitaire**

Ce modèle concerne la seconde partie de la thèse, dans laquelle les animaux subissent une opération chirurgicale dans le but de créer un défaut osseux cavitaire au niveau du fémur droit. Pour ce faire, l'animal est anesthésié par une injection intrapéritonéale d'un mélange Kétamine (100 mg/kg) / Médétomidine (Domitor à 10 mg/kg). La patte droite de l'animal est rasée à l'aide d'une tondeuse et la peau nettoyée à l'aide de bétadine. Après incision de la peau et dégagement de la masse musculaire, un trou d'un diamètre de 0.9 mm est pratiqué à l'aide d'une fraiseuse chirurgicale (Linvatec) au niveau de la tête distale du fémur droit de l'animal. Une fois l'opération réalisée, peau et muscles incisés sont suturés et l'animal reçoit une injection sous-cutanée de Buprénorphine à 50 µg/kg (Vétergesic) afin de réduire la douleur post-opératoire. La souris est ensuite réveillée par une injection intra-musculaire d'Atipamézole, un agoniste de la Médétomidine (Antisedan) à 1 mg/kg, puis réintégrée à l'animalerie, où une surveillance visuelle de l'animal est effectuée régulièrement. Deux injections quotidiennes de Buprénorphine (50 µg/kg) sont réalisées dans les trois suivants l'opération. Tous les animaux opérés n'ont été opérés que d'un seul fémur, le fémur droit. Aucune lésion n'était apportée au fémur gauche controlatéral.

## **B. Protocoles expérimentaux**

### **1. Etude des effets croisés de l'hypoxie respiratoire et de l'hypodynamie sur les progéniteurs et des cellules ostéocompétents**

#### **Description du protocole « caisson + suspension »**

Brièvement, ce protocole expérimental consiste à placer des souris C57bl/6J (n=10/lot) en suspension pendant 1 semaine de façon à induire une diminution des cellules ostéoblastiques. Dès le 3<sup>ème</sup> jour de suspension, les animaux sont soit hébergés dans un caisson d'altitude à 50 kPa pendant 4 jours (FiO<sub>2</sub>=10%) pour subir un épisode hypoxique, soit gardés en normoxie à 101 kPa (FiO<sub>2</sub>=21%). Des souris témoins non suspendues ont été également placées en conditions normoxique ou hypoxique. Quatre lots expérimentaux sont donc constitués (tableau III-1).

	<b>Normoxie</b>	<b>Hypoxie</b>
<b>Témoins</b>	<b>TN</b>	<b>TH</b>
<b>Suspendus</b>	<b>SN</b>	<b>SH</b>

**Tableau III-1 : Lots expérimentaux.**

Chronogramme (voir figure III-1) :

#### **J-7 : répartition par lot et acclimatation**

A la réception des animaux, une randomisation selon le poids est effectuée. Quatre lots expérimentaux sont constitués :

Lot Témoin-Normoxique (TN) : groupe expérimental témoin sans suspension ni période d'hypoxie.

Lot Suspension-Normoxique (SN): les souris sont suspendues pendant 7 jours (de J0 à J7).

Lot Témoin-Hypoxique (TH) : groupe expérimental témoin sans suspension mais placé en hypoxie hypobarique pendant quatre jours (de J3 à J7).

Lot Suspension-Hypoxique (SH) : les souris sont suspendues pendant 7 jours (de J0 à J7) et sont soumises à l'épisode hypoxique qui débute à partir du 3<sup>ème</sup> jour de suspension (de J3 à J7).

Les animaux randomisés subissent une période de stabulation d'une semaine dans les armoires de l'animalerie, avec pesée quotidienne. La litière est changée hebdomadairement, et l'eau des biberons deux fois par semaine

#### **J0 : début de la suspension**

J0 coïncide avec le début de la suspension pour les animaux des lots SN et SH.

#### **J3 : début de l'hypoxie**

A J3, l'hypoxie en caisson hypobare est initiée pour les souris des lots TH et SH. La diminution de pression se fait lentement à raison de 2 m/sec. Le plateau de la pression atmosphérique est fixé à 50 kPa (équivalent d'une altitude d'environ 5500 m) et est maintenu à ce niveau pendant les 4 jours.

#### **J7 : sacrifice des animaux**

A J7, les animaux sont ramenés à la pression atmosphérique puis immédiatement sacrifiés par exsanguination intracardiaque (ponction intraventriculaire) sous anesthésie gazeuse à l'isoflurane 5%.

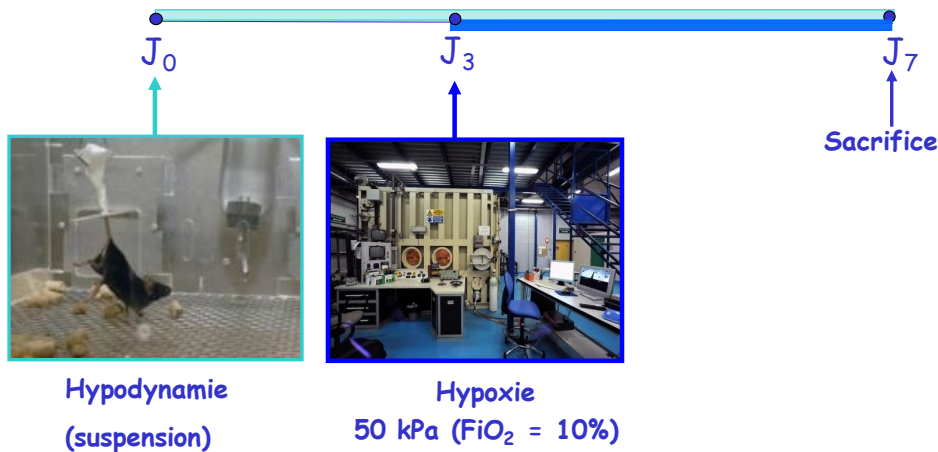


Figure III-1 : Chronogramme expérimental du protocole « opération + caisson ».

## 2. Etude des effets croisés de l'hypoxie respiratoire et de l'hypodynamie sur les progéniteurs et les cellules ostéocompétents dans le cadre de la réparation osseuse

### Description du protocole « opération + caisson + suspension »

Ce protocole expérimental a été conçu d'après le protocole « caisson + suspension ». Les étapes sont similaires mais le protocole s'applique cette fois aux souris TN, SN, TH et SH ayant subi un défaut osseux cavitaire. Ce protocole prend donc en compte le temps nécessaire à la réparation de ce défaut.

Chronogramme (figure III-2) :

#### **J-7 : réception et acclimatation**

A réception des animaux, une période de stabulation initiale d'une semaine a lieu dans les armoires de l'animalerie. Une pesée quotidienne des animaux est réalisée pendant toute la durée de l'acclimatation. La litière est changée hebdomadairement, et l'eau des biberons deux fois par semaine.

## **J0 : opération chirurgicale**

A l'issue de la période d'acclimatation, les animaux subissent une opération chirurgicale comme décrit en V. D.

## **J1 à J3 : traitement analgésique et répartition par lot**

Pour réduire la douleur post-opératoire, les animaux reçoivent des injections journalières (matin, midi et soir) sous-cutanées de Buprénorphine (50 µg/kg) de J1 à J3.

A J3, les animaux sont répartis en quatre groupes expérimentaux :

Lot Témoin-Normoxique (TN) : groupe expérimental témoin sans suspension ni période d'hypoxie.

Lot Suspension-Normoxique (SN) : les souris sont suspendues pendant 7 jours (de J4 à J11).

Lot Témoin-Hypoxique (TH) : groupe expérimental témoin sans suspension mais placé en hypoxie hypobarique pendant quatre jours (de J7 à J11).

Lot Suspension-Hypoxique (SH) : les souris sont suspendues pendant 7 jours (de J4 à J11) et sont soumises à l'épisode hypoxique qui débute à partir du 3<sup>ème</sup> jour de suspension (de J7 à J11).

## **J4 : début de la suspension**

J4 marque le début de la suspension pour les animaux des lots SN et SH.

## **J7 : début de l'hypoxie**

A J7, l'hypoxie en caisson hypobare est initiée pour les souris des lots TH et SH. La diminution de pression se fait lentement à raison de 2 m/sec. Le plateau de la pression



atmosphérique est fixé à 50 kPa (équivalent d'une altitude d'environ 5500 m). Il est maintenu à ce niveau pendant les 4 jours.

### J11 : sacrifice des animaux

A J11, les animaux sont ramenés à la pression atmosphérique puis immédiatement sacrifiés par exsanguination intracardiaque (ponction intraventriculaire) sous anesthésie gazeuse à l'isoflurane 5%.

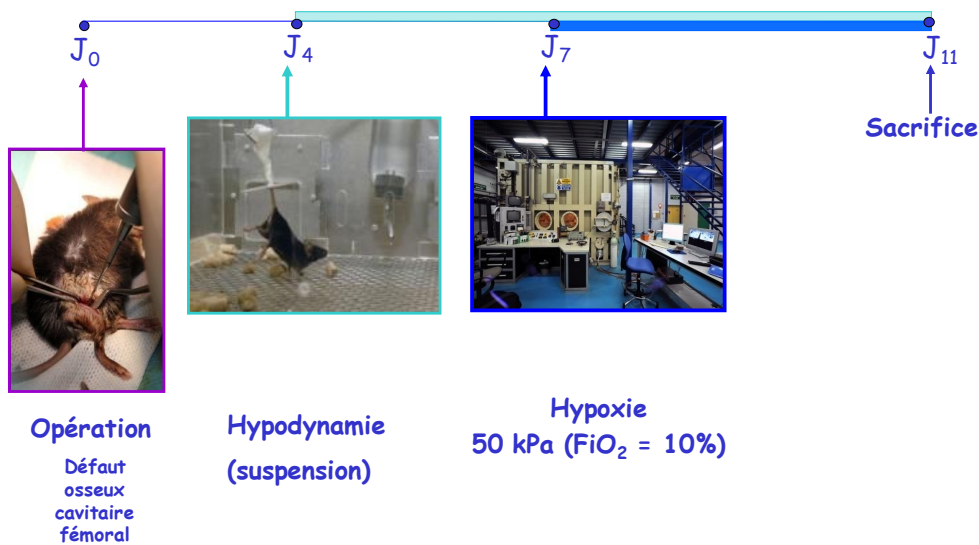


Figure III-2 : Chronogramme expérimental du protocole « opération + suspension + caisson ».

## C. Méthodes d'analyses

### 1. Micro-tomographie

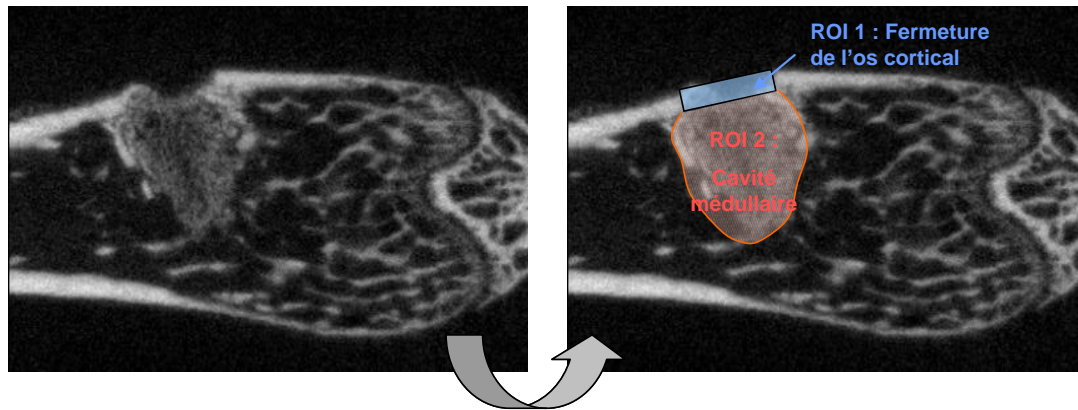
L'imagerie par rayons X a été réalisée par le scanner SkyScan 1174 (SkyScan, Belgique). Tous les fémurs opérés ont été scannés avec un pas de balayage en spirale égal à 0.3° et à la résolution isotropique de 6.74  $\mu\text{m}$  (source de rayons X à 50kV). La reconstruction en trois dimensions a été réalisée à l'aide des logiciels Nrecon V1.4 et CTan Software (SkyScan, Belgique).

Deux régions d'intérêt (ROI) ont été définies (figure III-3):

- Pour l'estimation de la fermeture de l'os cortical, le ROI est un cylindre (diamètre de la base = 0.9 mm, hauteur = 0.3 mm). Le diamètre de la base du cylindre correspond

au diamètre de la mèche utilisée pour la création du défaut osseux, et sa hauteur coïncide avec l'épaisseur de la corticale.

- Le second ROI, appliqué pour l'estimation du comblement du défaut osseux, englobe les régions d'os néoformé dans la cavité médullaire (avec exclusion du premier ROI).



**Photographie III-3 : Schéma d'explication des régions d'intérêt pour l'évaluation de la réparation osseuse d'un défaut cavitaire.**

## 2. Statistiques

Une analyse de variance (Anova) à deux facteurs croisés (suspension et hypoxie) a été utilisée afin de détecter d'éventuelles interactions entre les facteurs.

Au terme de l'Anova, une interaction significative entre deux facteurs A et B ( $p < 0.05$ ) signifie que l'effet du facteur A sur le paramètre étudié varie en fonction des modalités du facteur B. Dans le contexte de notre protocole, une interaction hypoxie x suspension indique que l'effet de l'hypoxie sur le paramètre étudié n'est pas le même selon que l'animal est suspendu ou témoin. Dans ce cas, nous avons eu recours à des tests à posteriori de type Newman Keuls pour procéder aux comparaisons multiples entre groupes.

En l'absence d'interaction, chacun des deux facteurs hypoxie ou suspension peut avoir un effet significatif global, appelé pur (pour des  $p < 0.05$ ).

## IV. Résultats

### 1. Etude des effets croisés de l'hypoxie respiratoire et de l'hypodynamie sur la régulation des progéniteurs et des cellules ostéocompétents.

L'**objectif** de cette première partie est l'évaluation des effets croisés de l'hypoxie respiratoire et de la suspension hypodynamique sur la mobilisation des progéniteurs ostéocompétents et sur les cellules différenciées qui en dérivent.

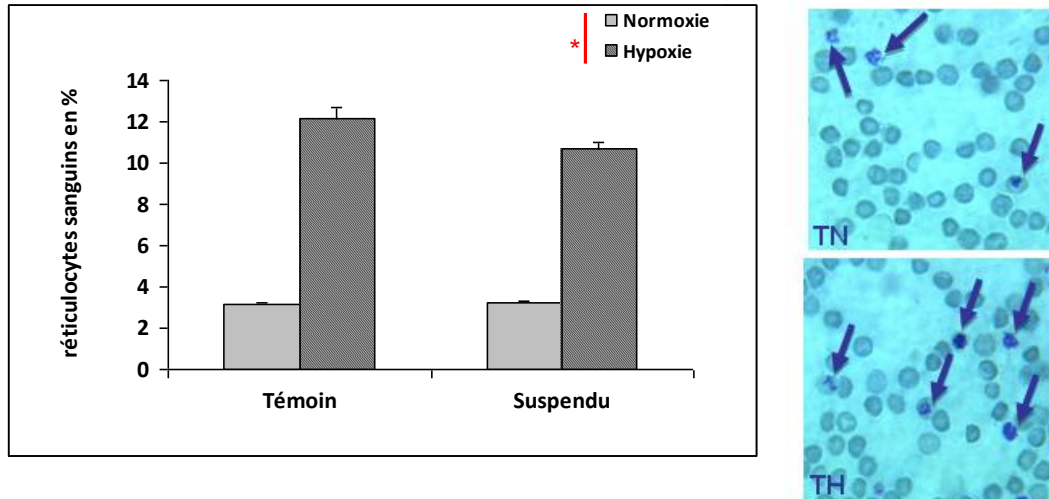
Le protocole expérimental, décrit en III.5.a, a permis de tester nos **hypothèses de travail** selon lesquelles i) l'hypoxie respiratoire mobilise les progéniteurs ostéocompétents de la moelle vers la rate et ii) la suspension hypodynamique diminue le pool de progéniteurs ostéocompétents disponibles pour la mobilisation.

Le **résultat attendu** est que la mobilisation des progéniteurs ostéocompétents sous hypoxie est modulée par la suspension hypodynamique.

#### a) Effets de l'hypoxie et de la suspension hypodynamique dans le sang

##### **(1) L'hypoxie augmente les taux circulants de réticulocytes et d'érythropoïétine (Epo) et module la formulation sanguine des animaux témoins et suspendus.**

Comme montré sur la figure IV-1, la diminution de la tension en oxygène engendre une augmentation des **réticulocytes sanguins**. En effet, le pourcentage de réticulocytes dans le sang, estimé après coloration au bleu de crésyl brillant, est multiplié par 3.6 entre les animaux normoxiques et les animaux hypoxiques (moyenne des lots TN + SN = 3.16 +/- 0.12 % vs moyenne TH + SH = 11.42 +/- 0.44 %). La suspension et l'hypoxie n'interagissent pas entre elles. La suspension seule n'a pas d'effet sur le paramètre.

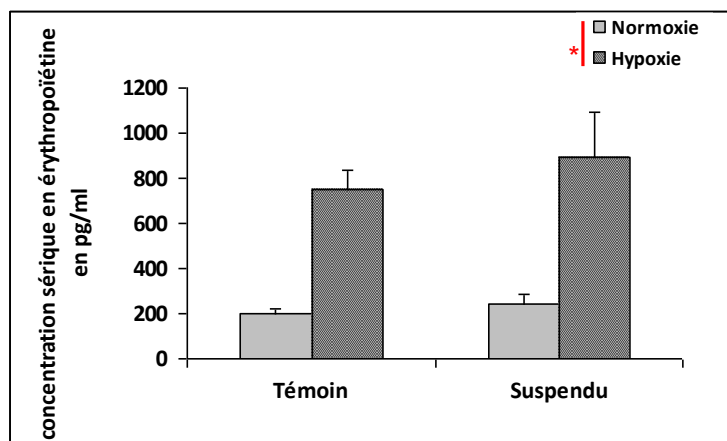


**Figure IV-1 : Réticulocytes sanguins.**

A gauche : pourcentage des réticulocytes sanguins. Un effet pur de l'hypoxie est constaté ( $p=0.0002$ ),  $n=5$  /lot.

A droite : coloration au bleu de crésyl brillant révélant les filaments réticulaires des réticulocytes (flèches bleues) pour les lots TN (haut) et TH (bas).

Une mesure de l'**érythropoïétine** dans le sérum des souris (figure IV-2) a été réalisée. L'analyse statistique n'a pas révélé d'interaction hypoxie x suspension, ni d'effet pur de la suspension. En revanche, comme attendu, une augmentation de la concentration en érythropoïétine a été mise en évidence chez les animaux placés en caisson hypobare.



**Figure IV-2 : Concentration en érythropoïétine sérique (en pg/mL).**

Un effet pur de l'hypoxie est mis en évidence ( $p<0.0001$ ),  $n=5$  /lot.

Concernant la **formulation sanguine**, l'analyse statistique révèle un effet pur de l'hypoxie sans effet de la suspension ni d'interaction hypoxie x suspension pour cinq des paramètres mesurés. Sont statistiquement augmentés sous hypoxie (cf tableau IV-1) :

- Le taux de leucocytes sanguins
- Le pourcentage de monocytes dans le sang
- Le taux d'érythrocytes
- L'hématocrite
- Le taux d'hémoglobine.

Ces résultats indiquent que l'hypoxie exerce des effets à la fois sur la lignée leucocytaire et sur la lignée érythroïde. Elle augmente le nombre de globules blancs, et modifie leur composition dans le sang. Le pourcentage des monocytes sous hypoxie augmente de 36.7%. Toutefois, cette diminution n'est pas significative. D'autre part, l'hypoxie module la lignée rouge en augmentant le nombre d'érythrocytes (+14.2 %) ainsi que l'hématocrite (moyenne des lots TN+SN = 41.3 +/- 1.0 ; moyenne des lots TH+SH = 48.9 +/- 2.32) et l'hémoglobine (moyenne des lots TN+SN = 10.35 +/- 0.26 ; moyenne des lots TH+SH = 12.25 +/- 0.49).

	Leucocytes (x103 cell/ $\mu$ l)	% lymphocytes	% monocytes	% granulocytes	Erythrocytes (x103 cell/ $\mu$ l)	Hématocrite (%)	Hémoglobine (g/dl)	Plaquettes (x103 cell/ $\mu$ l)
TN	3,23 +/- 0,29	88,02 +/- 1,96	6,84 +/- 1,09	5,16 +/- 0,97	10,13 +/- 0,47	42,40 +/- 1,84	10,44 +/- 0,44	1332,40 +/- 64,44
TH	4,46 +/- 0,92	85,20 +/- 2,61	8,10 +/- 1,12	6,70 +/- 1,63	11,10 +/- 0,64	48,98 +/- 2,96	12,22 +/- 0,53	1302,20 +/- 119,80
SN	2,42 +/- 0,47	90,22 +/- 1,45	5,72 +/- 0,69	4,08 +/- 0,82	9,69 +/- 0,21	40,20 +/- 1,05	10,26 +/- 0,32	1287,00 +/- 58,57
SH	4,15 +/- 0,73	86,02 +/- 1,41	9,08 +/- 0,66	4,92 +/- 0,87	11,51 +/- 0,48	48,96 +/- 2,09	12,28 +/- 0,50	1392,80 +/- 61,80

**Tableau IV-1 : Numération de la formulation sanguine.**

Sang recueilli sur anticoagulant citrate lors du sacrifice des animaux (n=5/lot). Les paramètres indiqués en **bleu** sont ceux pour lesquels un effet de l'hypoxie a été mis en évidence (n=5/lot)

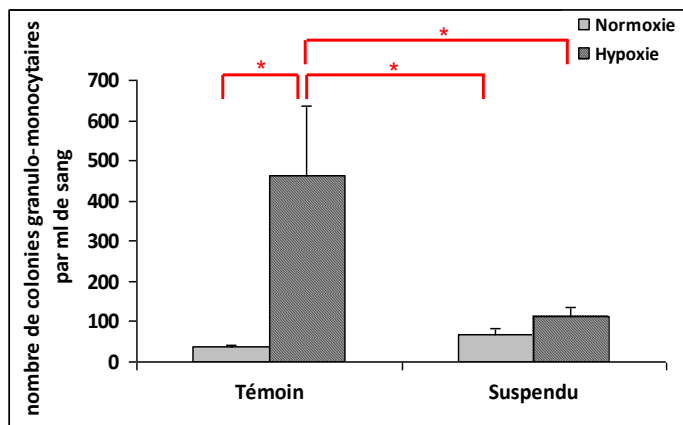
- Taux des leucocytes sanguins : p = 0.03
- Pourcentage de monocytes dans le sang : p=0.022
- Taux d'érythrocytes : p=0.0095
- Hématocrite : p=0.0021
- Taux d'hémoglobine : p=0.0007.

**(2) L'hypodynamie module l'augmentation des progéniteurs hématopoïétiques dans le sang induite par l'hypoxie.**

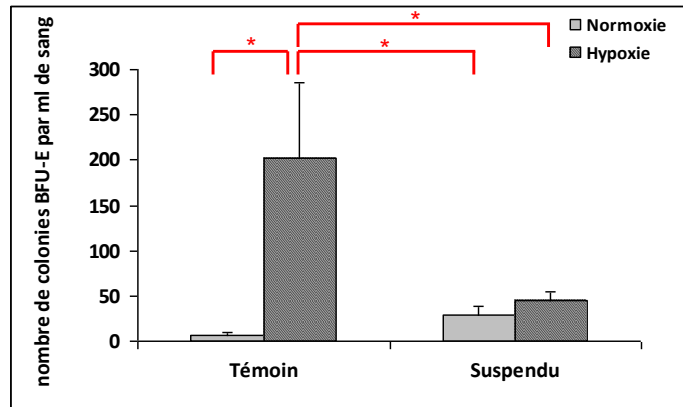
L'analyse Anova à deux facteurs croisés met en évidence une interaction hypoxie x suspension à  $p=0.05$  touchant à la fois les **progéniteurs granulo-monocytaires** (mix CFU-G / CFU-M / CFU-GM, figure IV-3) et les **progéniteurs érythrocytaires BFU-E** (figure IV-4). L'interaction indique que les effets de l'hypoxie diffèrent selon le statut témoin ou suspendu de l'animal. En effet, le test post-hoc met en évidence une augmentation des progéniteurs granulo-monocytaires et érythrocytaires uniquement chez les animaux témoins.

Pour les deux types de progéniteurs, le test Newman-Keuls détecte des différences significatives entre :

- Les lots Témoin Normoxique (TN) et Témoin Hypoxique (TH)
- Les lots Témoin Hypoxique (TH) et Suspendu Hypoxique (SH)
- Les lots Témoin Hypoxique (TH) et Suspendu Normoxique (SN)



**Figure IV-3 : Nombre de colonies granulo-monocytaires par mL de sang.**  
(n= 10 /lot).



**Figure IV-4 : Nombre de colonies BFU-E par mL de sang.**  
(n= 10 /lot).

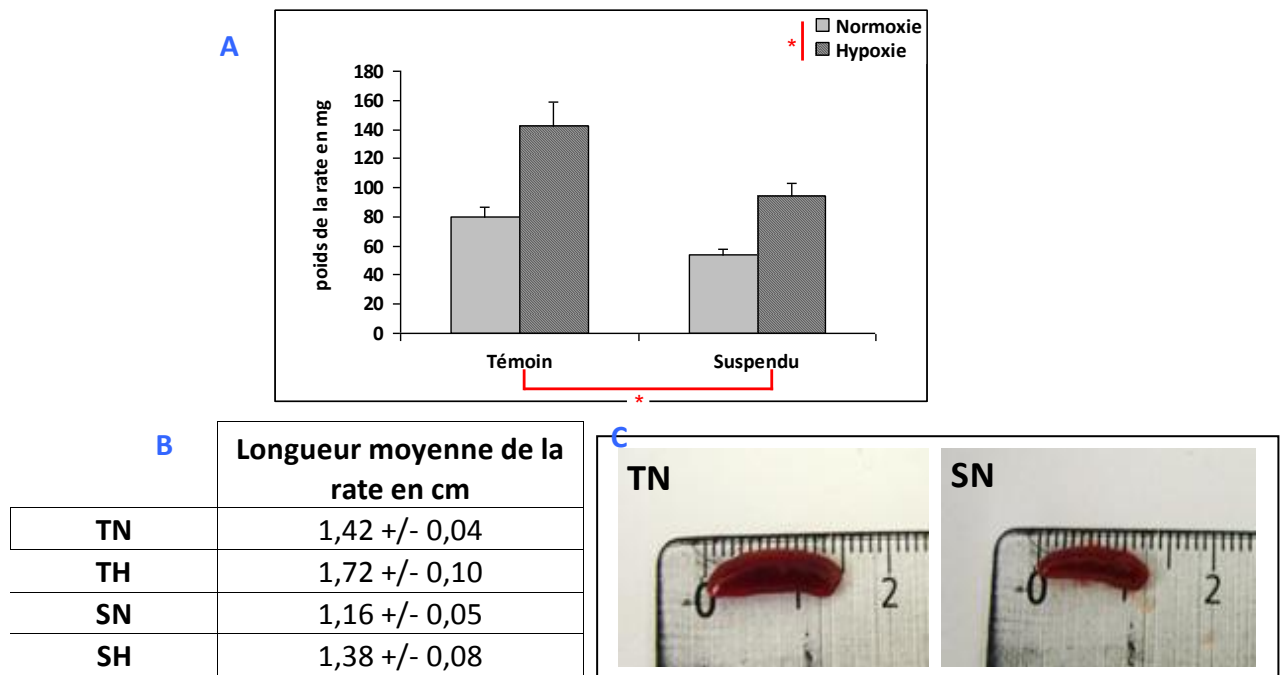
Chez les animaux suspendus, l'hypoxie n'est plus capable d'induire une augmentation des colonies dans le sang. La suspension modère donc la hausse des progéniteurs hématopoïétiques dans le sang sous hypoxie.

## **b) Effets de l'hypoxie et de la suspension hypodynamique dans la rate**

### ***(1) L'hypoxie respiratoire entraine une splénomégalie.***

Hypoxie et suspension exercent des effets purs sur le **poids** de la rate (figure IV-5, panel A). Ainsi, l'épisode hypoxique augmente le poids de la rate, avec une moyenne des lots TN et SN de 66.74 +/- 5.13 mg passant à 118.68 +/- 12.64 mg pour les lots TH et SH ( $p = 0.0001$ ). A l'inverse, le poids de l'organe est diminué ( $p = 0.0024$ ) chez les SN et les SH (moyenne de 74.02 +/- 6.43) par rapport aux TN et TH (moyenne de 111.40 +/- 11.34). De façon similaire, et comme illustré par les photographies ci-dessus, la taille de l'organe est diminuée (panels B et C) sous suspension ( $p = 0.0007$ ), alors qu'une **splénomégalie** (+ 20.1 %) est visible chez les animaux hypoxiques ( $p = 0.002$ ).





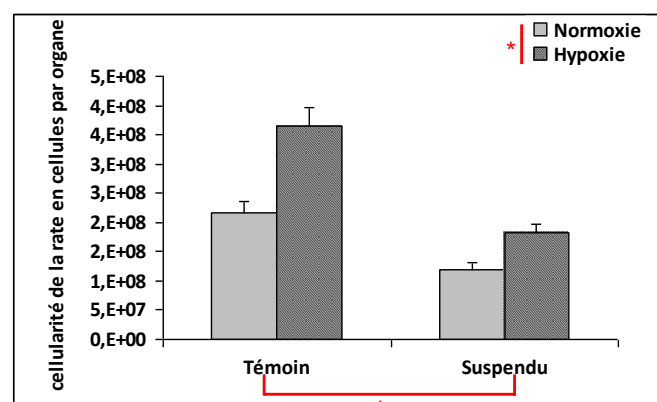
**Figure IV-5 : Augmentation du poids de la rate en hypoxie.**

En haut (A), poids moyen de la rate en mg chez les animaux des quatre lots (n=10/lot).

En bas à gauche (B), longueur moyenne des rates, mesurée en cm (n=5/lot). A droite (C), photographies illustrant la diminution de taille de la rate chez le lot SN en comparaison du lot TN. La rate SN est plus petite et moins charnue.

Ces changements de morphologie s'accompagnent d'un changement dans la **cellularité** de l'organe. La figure IV-6 illustre la cellularité de la rate, c'est-à-dire le nombre de cellules nucléées contenues dans l'organe.

Aucune interaction n'est notée entre la suspension et l'hypoxie, mais nous constatons un effet significatif de chacun des deux facteurs sur le paramètre. L'hypoxie augmente de 1,6 fois le contenu cellulaire de la rate, tandis que la suspension diminue le paramètre d'un facteur 1,94.



**Figure IV-6 : Nombre de cellules nucléées par rate.**

L'effet pur de l'hypoxie augmente la cellularité de la rate ( $p < 0.0001$ ).

L'effet pur de la suspension diminue la cellularité de la rate ( $p < 0.0001$ ).

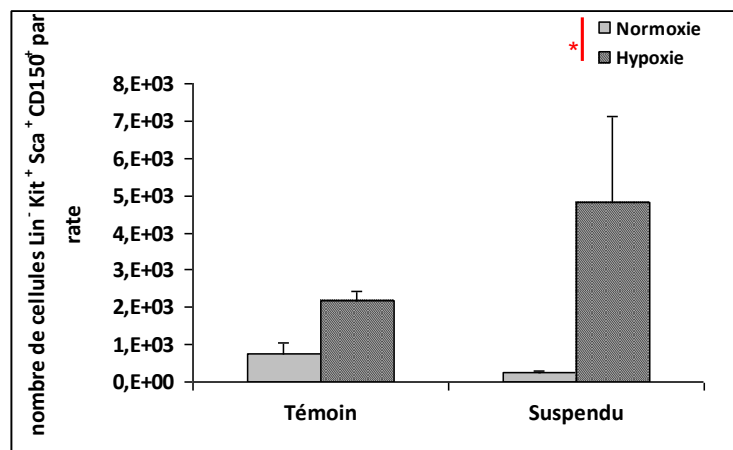
(n=5/lot).

**(2) Les CSH/PH de la rate sont augmentés par l'hypoxie respiratoire.**

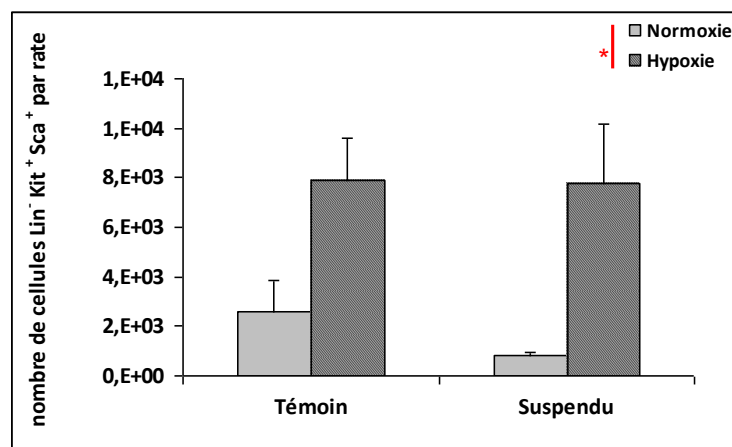
Les nombres de cellules  $\text{Lin}^- \text{Sca}^+ \text{Kit}^+ \text{CD150}^+$  et  $\text{Lin}^- \text{Sca}^+ \text{Kit}^+$  par rate sont montrés sur les figures IV-7 et IV-8 respectivement.

L'analyse statistique n'a pas révélé d'interaction hypoxie x suspension ni d'effet pur de la suspension sur les CSH/PH de type  $\text{Lin}^- \text{Sca}^+ \text{Kit}^+ \text{CD150}^+$  et  $\text{Lin}^- \text{Sca}^+ \text{Kit}^+$ .

Par contre, il est montré un effet de l'hypoxie qui augmente massivement le nombre de progéniteurs précoces KLS  $\text{CD} 150^+$  et KLS. Ainsi, dans la rate, l'hypoxie multiplie par 6,88 le nombre de progéniteurs KLS  $\text{CD} 150^+$  et augmente d'un facteur 4,5 celui des progéniteurs KLS.



**Figure IV-7 : Nombre de cellules  $\text{Lin}^- \text{Sca}^+ \text{Kit}^+ \text{CD150}^+$  par rate.**  
L'hypoxie augmente les cellules KLS  $\text{CD} 150^+$  ( $p=0.02$ ).  
( $n=5/\text{lot}$ ).



**Figure IV-8 : Nombre de cellules  $\text{Lin}^- \text{Sca}^+ \text{Kit}^+$  par rate.**  
L'hypoxie augmente les cellules KLS ( $p=0.0017$ ).  
( $n=5/\text{lot}$ ).

Un effet pur de l'hypoxie est visualisé pour les **progéniteurs granulo-monocytaires** (mix CFU-G / CFU-M / CFU-GM, figure IV-9) sans interaction hypoxie x suspension, et sans effet de la suspension. L'épisode hypoxique augmente d'un facteur 4 le nombre de CFU-G+M+GM dans la rate, en passant de  $8.70 \pm 1.89 \times 10^3$  colonies (moyenne des lots TN et SN) à  $35.2 \pm 6.51 \times 10^3$  colonies (moyenne des lots TH et SH).

L'hypoxie multiplie par 6 le nombre de **progéniteurs érythrocytaires** dans la rate. La moyenne des lots normoxiques s'élève à  $3.82 \pm 0.83 \times 10^3$  colonies tandis qu'elle atteint  $22.22 \pm 6.25 \times 10^3$  colonies chez les lots hypoxiques (figure IV-10).



Figure IV-9 : Quantité de colonies granulo-monocytaires par rate.

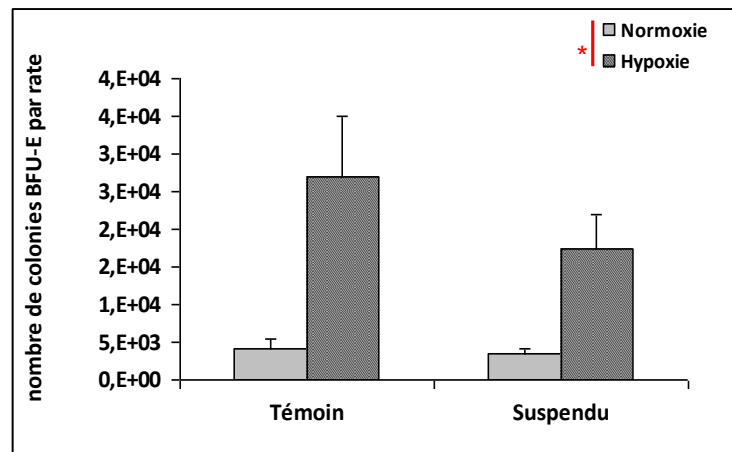


Figure IV-10 : Quantité de colonies érythrocytaires par rate.

L'hypoxie *in vivo* augmente le nombre de colonies érythrocytaires dans la rate ( $p < 0.0001$ ).  
( $n=10$ /lot).

### c) Moelle osseuse et os

#### ***(1) L'hypoxie respiratoire augmente la cellularité de la moelle osseuse mais ne modifie pas le pool de progéniteurs $Lin^- Sca^+ Kit^+ CD150^+$ et $Lin^- Sca^+ Kit^+$***

Le **nombre de cellules nucléées** par fémur a été déterminé pour chacun des quatre lots d'animaux (figure IV-11).

L'Anova à deux facteurs croisés révèle une influence de l'hypoxie sans aucun effet de la suspension ni de l'interaction hypoxie x suspension. Quel que soit le statut de l'animal (suspendu ou témoin), l'hypoxie diminue en moyenne de 28,4 % le nombre de cellules nucléées par fémur.



**Figure IV-11 : Nombre de cellules nucléées par fémur de souris.**

Effet pur de l'hypoxie qui diminue le nombre de cellules nucléées dans les fémurs ( $p=0.017$ ). ( $n=10$ /lot).

Concernant les CSH/PH, l'analyse des variances met en évidence l'absence d'interaction hypoxie x suspension pour le nombre de **progéniteurs précoces  $KLSCD150^+$**  ( $p=0.81$ , figure IV-12) ou **KLS** ( $p=0.82$ , figure IV-13).

Comme apparent sur la figure IV-12, le nombre de progéniteurs KLS  $CD150^+$  tend à augmenter dans la moelle osseuse sous hypoxie, mais de façon non significative ( $p=0.17$ ). La suspension n'a pas d'influence sur le nombre de cellules KLS  $CD150^+$  médullaires ( $p=0.57$ ).

Hypoxie et suspension n'ont pas d'effets purs sur le nombre de progéniteurs KLS médullaires ( $p=0.32$  pour l'hypoxie et  $p=0.69$  pour la suspension)

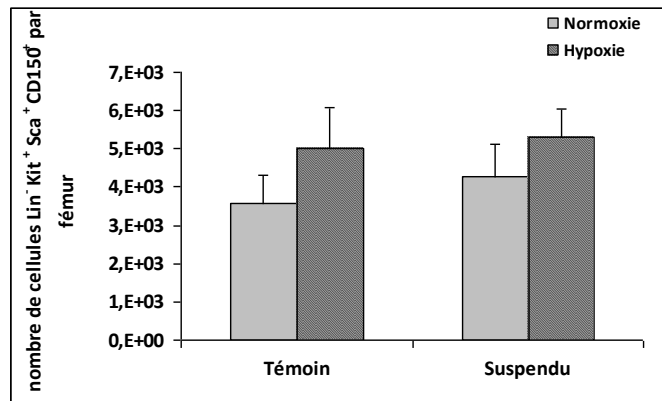


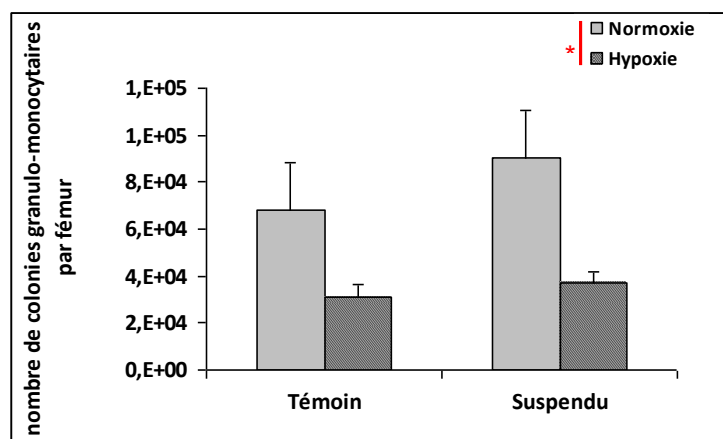
Figure IV-12 : Nombre de cellules Lin- Kit+ Sca+ CD150+ par fémur de souris. (n=5/lot).



Figure IV-13 : Nombre de cellules Lin- Kit+ Sca+ par fémur de souris. (n=5/lot).

***(2) L'hypodynamie module la déplétion médullaire des progéniteurs mésenchymateux et érythrocytaires induite par l'hypoxie respiratoire, un effet qui pourrait passer par la chimiokine SDF-1.***

L'hypoxie exerce un effet pur sur la **lignée granulo-monocytaire** (mix CFU-G / CFU-M / CFU-GM) de la moelle osseuse en abaissant le nombre de colonies de 42.8 % (figure IV-14). Le statut suspendu ou témoin de l'animal ne modifie en rien la déplétion des colonies granulo-monocytaires induite par l'hypoxie (absence d'interaction à  $p=0.29$ ).

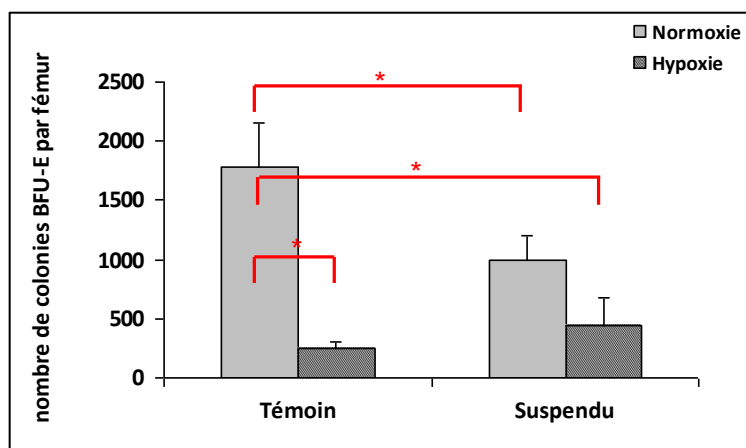


**Figure IV-14 : Quantité de colonies granulo-monocytaires par fémur.**  
 Un effet pur de l'hypoxie est mis en évidence ( $p < 0.0001$ ).  
 ( $n=10/\text{lot}$ ).

Il n'en est pas de même pour les **progéniteurs érythrocytaires BFU-E**, pour lesquels une interaction hypoxie x suspension est mise en évidence (figure IV-15).

Le test post-hoc Newman-Keuls révèle alors une différence significative entre :

- Les lots TN et SN
- Les lots TN et TH
- Les lots TN et SH

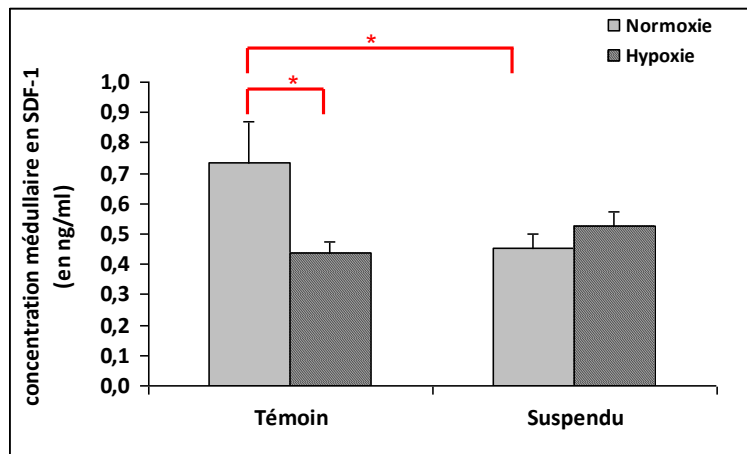


**Figure IV-15: Quantité de colonies érythrocytaires (BFU-E) par fémur.**  
 Une interaction entre l'hypoxie et la suspension ( $p = 0.04$ ) est constatée.  
 ( $n=10/\text{lot}$ ).

L'hypoxie agit donc différemment sur les BFU-E selon que l'animal est témoin ou suspendu. Chez les animaux témoins (TH vs TN), l'hypoxie abaisse le nombre de progéniteurs de 86 %. En revanche, lorsque l'animal est suspendu, l'hypoxie ne diminue plus de façon significative

le pool de BFU-E (SH vs SN). Pour ce lot d'animaux, la suspension limite la diminution de BFU-E induite par l'hypoxie.

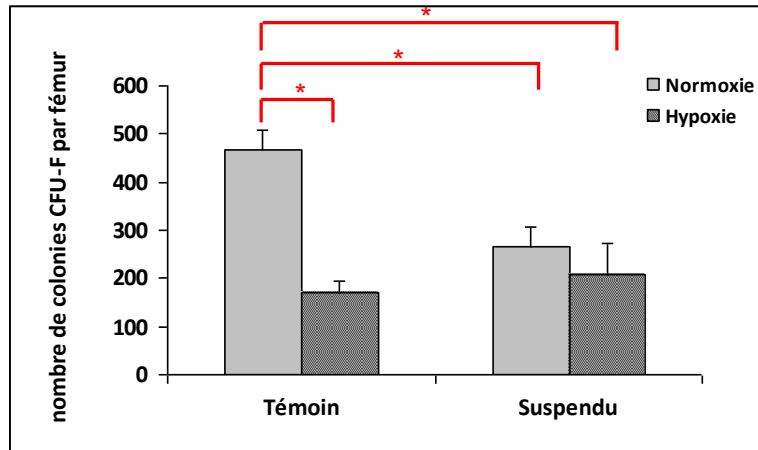
Une interaction hypoxie x suspension est révélée pour la **concentration de SDF-1**, chimiokine impliquée dans la mobilisation des progéniteurs hématopoïétiques (figure IV-16). Des différences significatives sont signifiées entre les lots SN et TN d'une part et TN et TH d'autre part. En condition hypoxique, la suspension restreint la baisse de la chimiokine (lot SH).



**Figure IV-16 : Concentration médullaire en SDF-1 (ng/ml).**

Une interaction entre l'hypoxie et la suspension ( $p = 0.03$ ) est constatée. ( $n=5/\text{lot}$ ).

Concernant les **progéniteurs mésenchymateux**, une interaction hypoxie x suspension est mise en évidence, avec un profil similaire à celui observé pour les colonies BFU-E de la moelle (figure IV-17). Chez les animaux normoxiques, la suspension induit la diminution des progéniteurs mésenchymateux d'un facteur 1.74. Le lot TN compte en moyenne  $466 \pm 42.6$  colonies CFU-F par fémur contre  $267 \pm 38.6$  colonies pour le lot SN. Sous hypoxie, on observe une baisse des CFU-F dans les fémurs des animaux témoins. En revanche, lorsque l'animal est suspendu, l'hypoxie ne diminue plus de façon significative le pool médullaire de progéniteurs mésenchymateux (lots SN et SH). La suspension limite donc la diminution des progéniteurs mésenchymateux de la moelle générée par l'hypoxie.



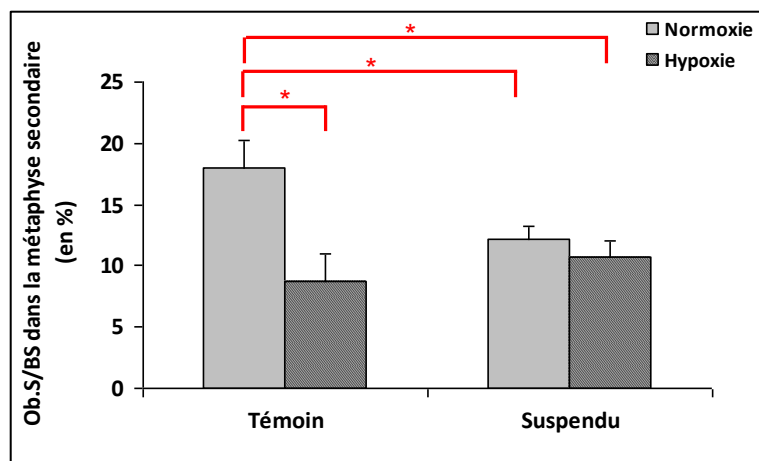
**Figure IV-17 : Quantité de colonies mésenchymateuses CFU-F par fémur.**  
 Une interaction entre l'hypoxie et la suspension ( $p = 0.01$ ) est constatée.  
 ( $n=10/\text{lot}$ ).

***(3) Hypoxie et suspension diminuent la surface de formation osseuse et augmentent la surface de résorption.***

La **surface de formation osseuse** dans la métaphyse secondaire, correspondant à la surface de l'os occupée par les ostéoblastes (paramètre **Ob.S/BS**), montre une interaction hypoxie x suspension (figure IV-18).

Le test Newman-Keuls signale des différences entre :

- Les lots TN et SN
- Les lots TN et TH
- Les lots TN et SH



**Figure IV-18 : Ob.S/BS calculé dans la métaphyse secondaire.**  
 Une interaction entre l'hypoxie et la suspension ( $p = 0.005$ ) est constatée.  
 ( $n=5/\text{lot}$ ).



Chez les animaux normoxiques, la suspension diminue le paramètre Ob.S/BS (18 +/- 2 % chez les TN contre 12 +/- 1% chez les SN). Chez les animaux témoins (lots TH vs TN), l'hypoxie diminue la surface de formation de 50%. Un effet modulateur de la suspension en condition hypoxique est mis en évidence, la surface de formation chez les animaux du lot SH n'étant significativement pas différente de celles observées chez les lots TH et SN.

Le profil du paramètre Ob.S/BS est identique à celui obtenu pour les CFU-F (figure IV-17).

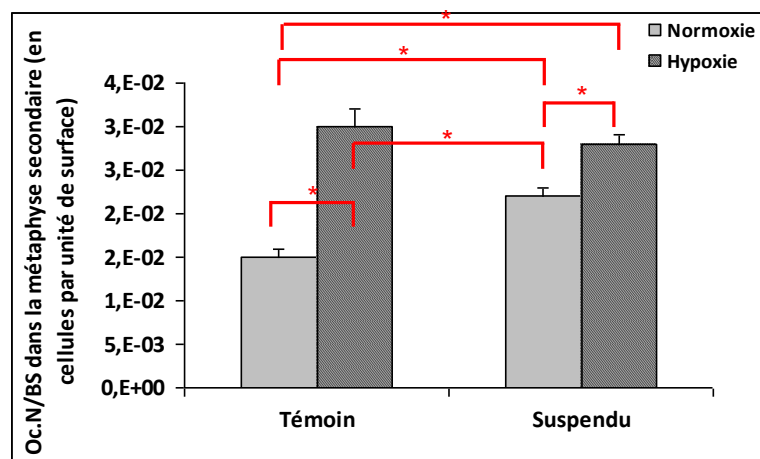
Le nombre d'ostéoclastes par unité de surface (**Oc.N/BS**), correspondant au paramètre d'évaluation de l'**activité de résorption osseuse** dans la métaphyse secondaire, montre lui aussi une interaction hypoxie x suspension.

Des différences significatives sont rencontrées entre (figure IV-19) :

- Lots TN et TH
- Lots TN et SN
- Lots TN et SH
- Lots TH et SN
- Lots SN et SH

Chez les animaux témoins (TH vs TN), l'hypoxie augmente significativement le nombre d'ostéoclastes par unité de surface dans la métaphyse secondaire (+ 100%).

Chez les animaux normoxiques (SN vs TN), la suspension augmente significativement le paramètre Oc.N/BS (+ 46.6 %). Toutefois, dans un contexte hypoxique (TH vs SH), la suspension n'engendre alors plus d'augmentation significative de ce paramètre.



**Figure IV-19 : Oc.N/BS calculé dans la métaphyse secondaire.**

Une interaction entre l'hypoxie et la suspension ( $p = 0.02$ ) est constatée (n=5/lot)

## Conclusion & discussion sur les effets de l'hypoxie et de la suspension chez les animaux non opérés.

### Effets de l'hypoxie

**L'hypoxie chez les animaux témoins** (lot TH) entraîne une diminution du nombre des colonies érythrocytaires dans la moelle osseuse associée à une augmentation de leur nombre dans la circulation sanguine et la rate. Cette redistribution tissulaire témoigne de la mobilisation des progéniteurs BFU-E. Cette observation est concordante avec l'augmentation d'érythropoïétine sérique détectée chez les animaux TH. Synthétisée en réponse à la chute de la  $pO_2$ , l'Epo favorise la prolifération, la différenciation et la survie des cellules hématopoïétiques, plus particulièrement de la lignée érythrocytaire (Jelkmann 2011). Elle mène à l'augmentation des réticulocytes et des érythrocytes, comme observé chez nos animaux. Un autre argument de nature moléculaire en faveur de la mobilisation des progéniteurs érythrocytaires est la baisse constatée de la concentration en SDF-1 dans la moelle osseuse des animaux TH. (Petit, 2002).

Chez la souris, la rate est un organe hématopoïétique impliqué notamment dans la production des cellules érythrocytaires (Yanai, Satoh et al. 1991). L'augmentation de la cellularité et de la taille de la rate sous hypoxie évoque une hausse de l'activité de l'organe. Ceci est étayé par l'élévation observée du nombre des CSH/PH KLS CD150<sup>+</sup> et KLS qui pourrait être liée à l'augmentation de leur prolifération au sein de l'organe. L'accroissement du pool des BFU-E dans la rate sous hypoxie pourrait donc être le résultat du mécanisme de mobilisation observé, couplé à une production splénique de ces progéniteurs par différenciation des KLS CD150<sup>+</sup>/KLS. L'augmentation des progéniteurs granulo-monocytaires dans la rate peut également s'expliquer par les mêmes mécanismes. La mobilisation des CFU-G/M/GM est montrée par la déplétion du pool médullaire alliée à une augmentation dans le sang et la rate. Même si la production splénique de progéniteurs granulo-monocytaires est bien moins documentée que celle des BFU-E dans la littérature, elle ne peut pas être exclue chez les animaux TH. Les progéniteurs KLS ont été recherchés dans le sang, mais n'ont pas été mis en évidence.

Au niveau sanguin, une augmentation du nombre des leucocytes est observée. L'augmentation de leucocytes sous hypoxie hypobare a été rapportée par Osada en 1991.

Dans cette étude japonaise, des cochons d'Inde placés à la même altitude simulée que nos souris TH (50 kPa) présentaient une augmentation des globules blancs sanguins dès le troisième jour d'hypoxie (Osada 1991). La même année, Ghezzi et Dinarello ont montré que l'hypoxie déclenchait une hausse de la production de cellules mononucléées dans le sang humain, ainsi que la production d'IL-1 et de TNF par ces dernières (Ghezzi, Dinarello et al. 1991). L'augmentation de la proportion des monocytes dans le sang suggère une différenciation accrue de la lignée granulo-monocytaire sous hypoxie. De manière intéressante, l'augmentation des ostéoclastes dans la zone métaphysaire des animaux placés en caisson est en accord avec l'hypothèse d'une différenciation accrue des progéniteurs granulo-monocytaires par l'hypoxie. Ces données sont concordantes avec les nombreuses études *in vitro* montrant que l'hypoxie est un puissant stimulateur de l'ostéoclastogénèse (Arnett, Gibbons et al. 2003) (Fukuoka, Aoyama et al. 2005).

Concernant les progéniteurs mésenchymateux, la déplétion des colonies CFU-F dans la moelle est en accord avec leur mobilisation vers la circulation sanguine. Chez la souris, le faible nombre de ces progéniteurs circulants rend très difficile, d'un point de vue technique, leur mise en évidence dans le sang, mais, chez le rat, d'autres équipes ont montré que l'hypoxie respiratoire induisait le passage dans la circulation sanguine de progéniteurs mésenchymateux (Rocheffort, Bruno et al. 2006) (Liu, Yu et al. 2011).

L'hypoxie hypobare semble avoir un effet inhibiteur sur la différenciation des ostéoblastes. Ainsi, une diminution du nombre des ostéoblastes dans la métaphyse secondaire est mise en évidence chez les TH. Là encore, nos résultats *in vivo* concordent avec des données *in vitro* rapportant une inhibition de la différenciation des cellules stromales mésenchymateuses cultivées en condition hypoxique. Cet effet pourrait être lié à une diminution de l'expression transcriptionnelle de *bmp2* et de *runx2* dans les ostéoblastes par la voie Notch (Salim, Nacamuli et al. 2004) (Xu, Liu et al. 2013).

En résumé, nos résultats indiquent que l'hypoxie respiratoire chez les animaux témoins mobilise les progéniteurs ostéocompétents. Cette mobilisation est associée à une modulation du remodelage osseux par découplage attestée par l'augmentation des ostéoclastes et la diminution des ostéoblastes métaphysaires. Ces data sont en accord avec les données actuelles de la littérature obtenues sur la relation entre la mobilisation des progéniteurs hématopoïétiques et le remodelage osseux. Des études portant sur la

mobilisation des CSH par l'injection de G-CSF font état d'une hausse des ostéoclastes et d'une baisse des ostéoblastes (Kollet, Dar et al. 2006) (Katayama, Battista et al. 2006). Le lien entre mobilisation et remodelage est indéniable, mais les mécanismes moléculaires associés sont mal connus. Ils passeraient notamment par des molécules d'adhésion comme l'ostéopontine, la chimiokine SDF-1 ou bien encore la métalloprotéase MMP-9 (Li, Zhai et al. 2011).

### **Effets de la suspension**

Sur l'ensemble des paramètres étudiés au niveau de la rate des animaux **suspendus** placés **en condition normoxique** (lot **SN**), seule une diminution de la masse et de la cellularité globale de l'organe a été mise en évidence. L'hypoplasie de la rate est un effet communément observé chez les animaux suspendus. Elle traduirait une diminution globale de l'activité de l'organe avec une baisse de l'érythropoïèse et de la lymphopoïèse (Morey-Holton, Globus et al. 2005). Du reste, au niveau sanguin, une diminution des réticulocytes et de la concentration plasmatique en Epo a été montrée à plusieurs reprises chez les animaux suspendus (Chelnaya 1991) (Lange, Gibson et al. 1994) (Durnova, Kaplanskii et al. 1977). D'après Morey-Holton, l'inhibition de l'érythropoïèse chez les animaux suspendus trouverait son origine dans la diminution des besoins en O<sub>2</sub> des animaux due à la mise en décharge de leur système musculo-squelettique (Morey-Holton, Globus et al. 2005). Dans notre modèle, les paramètres sanguins ne sont pas impactés par la suspension. Les érythrocytes et l'hématocrite tendent à diminuer, mais leur baisse n'est pas significative. Toutefois, au niveau médullaire, l'hypodynamie réduit significativement le pool des progéniteurs érythrocytaires. Puisque cette baisse médullaire ne s'accompagne pas d'une hausse du nombre des progéniteurs au niveau du sang et de la rate, elle n'est donc vraisemblablement pas le signe d'une mobilisation. Elle pourrait davantage être l'indicateur d'une anémie sous-jacente, pas encore détectée au niveau sanguin.

L'absence d'effet de la suspension sur la taille des pools médullaire, sanguin et splénique des progéniteurs granulo-monocytaires conforte l'idée selon laquelle l'hypodynamie n'entraîne pas la mobilisation des progéniteurs hématopoïétiques.

Au niveau osseux, nos résultats indiquent une diminution des ostéoblastes dans la métaphyse secondaire. Cette diminution est concomitante avec la baisse de SDF-1, chimiokine provenant essentiellement des les ostéoblastes dans la moelle osseuse. La

diminution des ostéoblastes est concordante avec la réduction de la taille du pool des progéniteurs mésenchymateux mise en évidence, signifiant que moins de progéniteurs CFU-F doivent être disponibles à la différenciation. Cet effet de la suspension sur la lignée mésenchymateuse est bien documenté dans la littérature (Machwate, Zerath et al. 1994). L'absence de contraintes mécaniques entraîne une diminution du nombre des CFU-F dans la moelle ainsi qu'une diminution de leur potentiel de différenciation vers la lignée ostéoblastique, conduisant une baisse de la formation osseuse. Récemment, Vandamme et al ont aussi montré que des changements dans l'expression génique de certains marqueurs de l'angiogenèse (Vegfa, Hif1a, Angpt1) et du métabolisme énergétique (Prkaa2) intervenaient en réponse à la suspension au sein des progéniteurs mésenchymateux (Vandamme, Holy et al. 2012).

Les effets de la suspension sur la résorption osseuse sont plus controversés dans la littérature. Certaines études ne mettent pas en évidence d'effet de l'hypodynamie sur le nombre d'ostéoclastes (Dehority, Halloran et al. 1999) (Basso, Jia et al. 2005). Ici, nos résultats indiquent une augmentation significative des ostéoclastes, en accord avec d'autres études décrivant une augmentation de l'ostéoclastogenèse et de la résorption osseuse en réponse à la suspension (Wronski and Morey 1982) (David, Lafage-Proust et al. 2006). Il semble en fait que les effets de la suspension sur la résorption osseuse dépendent beaucoup des conditions expérimentales utilisées, et varient notamment selon l'âge et de la souche des animaux (Amblard, Lafage-Proust et al. 2003) (Sakai and Nakamura 2001).

Dans notre modèle de souris SN, l'augmentation des ostéoclastes concomitante à la diminution des ostéoblastes atteste d'un découplage du remodelage osseux. Les mécanismes moléculaires à l'origine de ce découplage n'ont pas été investigués au cours de ce travail, mais il a été fortement suggéré que ce contrôle indépendant de la résorption et de la formation soit médié par les ostéocytes. Ainsi, l'absence de contrainte mécanique chez la souris entraîne une augmentation de la sécrétion de sclérostine (Lin, Jiang et al. 2009) et de RANK-L (Xiong and O'Brien 2012) par ces cellules mécano-sensitives. Molécule inhibitrice de la voie Wnt, la surexpression de sclérostine est défavorable à l'ostéoblastogenèse. A l'inverse, l'augmentation de RANK-L promeut la différenciation des ostéoclastes.

Depuis une dizaine d'années, un rôle primordial est attribué aux ostéoblastes dans la régulation *in vivo* du nombre de CSH. En s'appuyant sur des modèles murins génétiques,

plusieurs études ont en effet montré qu'il était possible d'augmenter ou diminuer le pool médullaire de CSH en modulant le nombre d'ostéoblastes (Calvi, Adams et al. 2003) (Zhang, Niu et al. 2003) (Visnjic, Kalajzic et al. 2004). Dans notre modèle de suspension, une diminution du nombre des ostéoblastes est bien observée, mais elle ne s'accompagne pas d'une modification du pool médullaire des CSH KLS et KLS CD150<sup>+</sup>. Nos résultats concordent davantage avec l'étude de Lymperi (Lymperi, Horwood et al. 2008) qui a mis en évidence chez des animaux traités au strontium une augmentation du pool ostéoblastique sans augmentation des CSH. De façon plus précise, les auteurs de cette étude font la distinction entre la population globale des ostéoblastes (augmentée par le traitement pharmacologique) et une sous-population spécifique d'ostéoblastes N-Cadhérine<sup>+</sup> dont le nombre n'est pas augmenté par le traitement au strontium. Cette observation les amène à conclure que le nombre de CSH médullaire n'est pas corrélé au nombre global des ostéoblastes mais à celui de la sous-population N-Cadhérine positive. Une quantification des ostéoblastes N-Cadhérine<sup>+</sup> par immunomarquage serait tout à fait indiquée pour savoir si la taille de cette sous population cellulaire chez les animaux SN est similaire à celle des TN. Pour l'heure, le rôle des ostéoblastes N-Cadhérine<sup>+</sup> dans le contrôle des CSH reste toujours controversé. Ainsi, Sugimura et ses collaborateurs ont récemment montré que l'expression de la voie de signalisation non canonique Wnt dans les ostéoblastes N-Cadhérine<sup>+</sup> permet le maintien des CSH à l'état quiescent en condition d'homéostasie (Sugimura, He et al. 2012). D'autres études, comme celle de Greenbaum, montrent à l'inverse que la perte N-Cadhérine dans les cellules ostéoblastiques n'impacte pas la fonction des CSH à l'état basal (Greenbaum, Revollo et al. 2012).

En conclusion, nos résultats confirment que les effets de l'hypodynamie en condition normoxique conduisent à un découplage entre l'ostéo-formation et l'ostéo-résorption (augmentation de l'ostéo-résorption et diminution de l'ostéo-formation). En revanche, nous montrons ici que la suspension ne semble pas associée à une mobilisation des progéniteurs ostéocompétents.

L'analyse des modèles animaux TH et SN montre donc de façon très intéressante que la mobilisation des ostéoprogéniteurs est associée à un découplage du remodelage osseux (lot TH), mais *qu'à contrario*, un découplage du remodelage osseux n'est pas forcément associé à

une mobilisation des ostéoprogéniteurs (lot SN). Cela suggère que les mécanismes conduisant au découplage osseux sont différents entre les deux lots, l'un passerait par la mobilisation et l'autre par l'absence de contraintes mécaniques.

Le groupe expérimental SH, combinant les deux événements de suspension et d'hypoxie, constitue donc un outil d'intérêt pour la poursuite de l'investigation du lien entre le remodelage osseux et la mobilisation.

### **Effets de l'hypoxie et de la suspension**

Les données histomorphométriques du lot **SH** indiquent que les effets de la suspension et de l'hypoxie sur l'ostéo-résorption et l'ostéo-formation ne se cumulent pas, alors que nous aurions pu nous attendre à une exacerbation du découplage osseux chez ces animaux. Nos résultats indiquent plutôt que la suspension dans le contexte hypoxique restreint la hausse des ostéoclastes et la baisse des ostéoblastes dans la métaphyse secondaire. L'effet modérateur de l'interaction entre l'hypoxie et la suspension s'exerce également sur les progéniteurs mésenchymateux et érythrocytaires. En effet, nous constatons que la suspension restreint la déplétion médullaire des pools des BFU-E et des CFU-F observée sous hypoxie. Cela suggère donc que la suspension limite la mobilisation de ces progéniteurs initiée par l'hypoxie. L'analyse des progéniteurs BFU-E dans le sang conforte cette hypothèse puisque la quantité des colonies érythrocytaires dans le sang des animaux SH est inférieure à celle mesurée chez les animaux TH. Ces résultats sont ceux attendus, si on considère le fait que la suspension en condition normoxique diminue les pools médullaires des progéniteurs BFU-E et CFU-F, réduisant alors potentiellement leur disponibilité à la mobilisation.

Le pool médullaire des colonies granulo-monocytaires n'est quant à lui pas soumis à l'effet modérateur de l'interaction hypoxie/suspension. L'effet modérateur ne s'exerce pas non plus au niveau de la rate des animaux. Malgré cela, il est retrouvé de façon surprenante dans le sang des animaux, où la suspension modère la hausse du nombre des CFU-G/M/GM influée par l'hypoxie. Ce résultat aurait pu être expliqué par un accroissement de la différenciation des progéniteurs granulo-monocytaires en ostéoclastes chez les SH par rapport aux TH. Dans cette condition, les progéniteurs granulo-monocytaires, davantage engagés dans la voie de l'ostéoclastogénèse, auraient alors été moins disponibles à la mobilisation vers le sang, et auraient été retrouvés en plus petite quantité dans ce compartiment.

Les résultats obtenus au cours de cette première partie confirment que l'hypoxie respiratoire est un facteur de mobilisation des progéniteurs ostéocompétents. Cette propriété de l'hypoxie s'intègre pleinement dans le cadre de notre stratégie de thérapie cellulaire mise en œuvre pour la réparation des pertes de substance osseuse. En dépit de sa diminution, le potentiel mobilisateur de l'hypoxie persiste chez les animaux hypodynamiques. Cet effet nous semble suffisamment intéressant pour justifier l'étude des conséquences de l'hypoxie sur la réparation, en prenant en compte la composante de la perte des contraintes mécaniques, et c'est ce qui constitue la deuxième partie de mes résultats.



## 2. Etude des effets croisés de l'hypoxie respiratoire et de l'hypodynamie sur les progéniteurs et les cellules ostéocompétents dans le cadre de la réparation osseuse.

Article intitulé « *In vivo* hypobaric hypoxia performed during the remodeling process accelerates bone healing in mice », soumis dans la revue **Stem Cells Translational Medicine**.

## ***In vivo* hypobaric hypoxia performed during the remodeling process accelerates bone healing in mice**

Marjorie DURAND <sup>1</sup>, Jean-Marc COLLOMBET <sup>1</sup>, Sophie FRASCA <sup>1</sup>, Laurent BEGOT <sup>1</sup>, Jean-Jacques LATAILLADE <sup>2\*</sup>, Marie-Caroline LE BOUSSE-KERDILÈS <sup>3\*</sup> and Xavier HOLY <sup>1\*</sup>

1- Institut de Recherche Biomédicale des Armées – Département SMCF – 91223 Brétigny sur Orge cedex – France

2- Centre de Transfusion Sanguine des Armées – Service de Recherche – 92141 Clamart cedex - France

3- INSERM U972 – Hôpital Paul Brousse – 94807 Villejuif cedex – France

\*- These authors contributed equally to this work

### **Author's contributions:**

**MD:** Conception and design; collection and assembly of data; data analysis and interpretation.

**JMC:** Conception and design; collection and assembly of data; data analysis and interpretation; manuscript writing.

**SF:** Collection and assembly of data; data analysis and interpretation.

**JJL:** Participation to conception and design; financial support, data analysis and interpretation; final approval of manuscript.

**LB:** Collection and/or assembly of data.

**MCLBK:** Participation to conception and design; data analysis and interpretation, final approval of manuscript.

**XH:** Conception and design; financial support; collection and assembly of data; data analysis and interpretation; manuscript writing.

## ABSTRACT

We investigated the effects of respiratory hypobaric hypoxia on femoral bone defect repair in mice since hypoxia is believed to influence both mesenchymal (MSC) and hematopoietic (HSC) stem cell mobilization, a process involved in bone healing mechanism. To mimic the condition of non weight-bearing limb immobilization in patients suffering from bone trauma, our hypoxic mouse model was also subjected to hindlimb unloading.

A drill-hole was created in the right femur of adult male C57/BL6J mice. Four days after surgery, mice were subjected to hindlimb unloading for one week. Seven days after surgery, mice were either housed for 4 days into a hypobaric room ( $FiO_2 = 10\%$ ) or kept under normoxic conditions. Unsuspected control mice were either housed in hypobaric or normoxic conditions. Animals were sacrificed on post-surgery day 11 for the collection of both contralateral and lesioned femurs, blood and spleen.

Delayed hypoxia massively enhanced bone healing efficiency as assessed by microtomography. Proteome analysis and histomorphometric data suggested that bone repair improvement could rely on the acceleration of natural bone healing process rather than an extended mobilization of MSC (mesenchymal stem cell)-derived osteoprogenitors. Hindlimb unloading had only tiny effects on delayed hypoxia-enhanced bone healing efficiency.

## INTRODUCTION

Skeletal mass, structure and biomechanical properties are maintained by a dynamic balance between bone formation and resorption, two processes ensured by osteoblasts and osteoclasts, respectively. Osteoblasts originating from bone marrow mesenchymal stromal cells (MSCs) synthesize collagen-rich osteoid and trigger mineralization of this organic matrix. Derived from bone marrow hematopoietic stem cells (HSCs) along with monocyte/macrophage lineage, osteoclasts are responsible for bone matrix dissolution by releasing acids and proteases (for review see (Kular, Tickner et al. 2012)).

Some environmental factors are known to modulate bone cell fate, including progenitor proliferation, mobilization and differentiation as well as activity of mature cells. Among these environmental factors, hypoxia is of particular interest due to the existence of a hypoxic gradient in bone marrow (BM) despite the important vascularization of this tissue. Some bone areas such as the endosteal surface are defined as highly hypoxic tissue since O<sub>2</sub> concentration was estimated to be less than 1% using mathematical models based on *in vivo* animal studies (Eliasson and Jonsson 2010; Suda, Takubo et al. 2011; Maes, Carmeliet et al. 2012). Interestingly, most slow cycling HSCs reside in endosteal hypoxic niches (Parmar, Mauch et al. 2007; Kubota, Takubo et al. 2008; Xie, Yin et al. 2009) suggesting that these hypoxic niches are important for stem cell maintenance and proliferation (Eliasson, Rehn et al. 2010; Maes, Carmeliet et al. 2012).

Both *in vitro* and *in vivo* approaches confirmed the key role of hypoxic conditions on HSC cell fate and survival (Eliasson, Rehn et al. 2010; Takubo, Goda et al. 2010; Miharada, Karlsson et al. 2011; Rehn, Olsson et al. 2011). Culture of mammalian HSCs in hypoxic conditions maintains cell quiescence by decreasing proliferation and improves HSC

transplantation potential (Eliasson, Rehn et al. 2010; Guitart, Debeissat et al. 2011). If *in vitro* BM hypoxic environment favours HSC quiescence, respiratory hypoxia generates a different physiological response in animal models. Indeed, mice subjected to hypobaric-hypoxia exhibited an enhanced proliferation and mobilization of BM HSCs associated with a lineage fate change characterized by an increase in megakaryocyte-erythrocyte progenitors and a transient reduction in granulocyte-macrophage progenitors (Li, Huang et al. 2011).

Concerning BM MSCs, hypoxia also influences the proliferation and differentiation of these stem cells. However, the effects of *in vitro* hypoxic conditions in cultured MSCs remained controversial. Indeed, Rosova et al. (Rosova, Dao et al. 2008) demonstrated that hypoxic environment maintained human MSC viability and enhanced their mobility via Akt and HGF signaling, respectively. To the opposite, Raheja et al. (Raheja, Genetos et al. 2011) showed that hypoxia decreased human MSC migration through an HIF-1 $\alpha$  and RhoA-mediated pathway. The influence of hypoxia on MSC differentiation also remained under debate. If hypoxic conditions seemed to consensually attenuate MSC differentiation into adipogenic progeny (Fehrer, Brunauer et al. 2007; Wagegg, Gaber et al. 2012), these conditions could enhance (Wagegg, Gaber et al. 2012), inhibit (Xu, Liu et al. 2013) or have no influence (Fehrer, Brunauer et al. 2007) on the *in vitro* osteoblastic differentiation capacity on cultured mammalian MSCs. Similarly to HSCs, the *in vivo* involvement of hypobaric respiratory hypoxia has been assessed on MSC fate (Rochefort, Delorme et al. 2006; Liu, Yu et al. 2011). Both chronic (Rochefort, Delorme et al. 2006) and short-term (Liu, Yu et al. 2011) hypoxia in rats induced massive mobilization of MSCs into peripheral blood. This MSC mobilization was associated with an increase in serum levels of HIF-1 $\alpha$ , VEGF and SDF-1 $\alpha$  suggesting an improved MSC migration capacity and an enhanced angiogenesis under hypoxia (Liu, Yu et al. 2011).

Taking into account the positive effects of hypobaric respiratory hypoxia on *in vivo* HSC and MSC mobilization and the proven contribution of MSC and HSC mobilization in the early step of the bone repair process (Matsumoto, Atsuhiko et al. 2006; Kumagai, VasANJI et al. 2008; Granero-Molto, Weis et al. 2009; Pignolo and Kassem 2011), the present study aims at evaluating the influence of hypobaric respiratory hypoxia on bone healing. To enhance bone repair efficiency, we decided to delay the onset of the hypoxic treatment in order to extend the duration of the osteoprogenitor mobilization induced in the early step of the bone repair process.

In addition, to evaluate the impact of the immobilization generally applied to patient suffering from bone fracture, we combined hypoxia with hindlimb unloading in our mouse model subjected to femoral bone defect. Rodent tail suspension hindlimb unloading, initially developed to reproduce spaceflight weightlessness, is a validated model for bone remodeling alterations. In mice, one or 2 weeks hindlimb unloading induced bone loss generally associated with an increase in the osteoclast bone surface (Sakata, Sakai et al. 1999; Shahnazari, Kurimoto et al. 2012) and a decline in the osteoblast bone surface (Shahnazari, Kurimoto et al. 2012). *In vitro* assays on primary BM cell cultures evidenced a rapid and sustained effect of hindlimb unloading on mouse osteoprogenitor cell populations (Shahnazari, Kurimoto et al. 2012). Tail suspension triggered a sustained reduction in osteoblast progenitor (originating from MSC) and a massive but transient increase in osteoclast progenitors (derived from HSC). Due to the detrimental influence of limb immobilization on bone mass and osteoblast-driven bone formation in mammals, this unloading condition could be disadvantageous for the optimal efficiency of bone fracture healing in the context of an hypoxic treatment.

Thus, the goal of the present investigation was to determine the effects of respiratory hypobaric hypoxia combined or not with hindlimb unloading on femoral bone healing efficiency in mice. Using X-ray microtomography ( $\mu$ CT) measurements, we demonstrate that delayed hypoxic treatment massively enhances bone repair in our animal model while tail suspension does not impact the healing process. As assessed by bone histomorphometry, quantification of bone marrow HSC and MSC clonogenic colonies and proteome analysis, we suggest that delayed hypoxia accelerates the natural bone healing mechanism independently of an extended MSC mobilization.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Animal care**

Eight-week-old male C57BL/6J mice (Janvier Laboratories, France) were individually housed in cages under standard conditions of temperature ( $22 \pm 1^\circ\text{C}$ ) and hygrometry (45-65%) with a 12h:12h light-dark cycle (lights on between 07:00 and 19:00). Mice had free access to water and standard laboratory chow. All the investigations were reviewed and approved by the Institutional Animal Care and Research Advisory Committee of IRBA in accordance with French law and the main international guidelines.

### **Validation of experimental murine models**

To validate our experimental murine models of hypoxia and hindlimb unloading, the physiological changes induced by these two environmental conditions were assessed on mice free of any bone defect. For this purpose, mice were subjected to 7 days of tail suspension (S group;  $n = 10$ ) as previously described in rats (Machwate, Zerath et al. 1994) or 4 days of respiratory hypoxia in a hypoxic chamber at 50 kPa corresponding to 10%  $\text{FiO}_2$  (H group;  $n = 10$ ). Control animals ( $n = 10$ ; C group) were similarly cared except they were not subjected to either hypoxic condition or hindlimb unloading. For sacrifice, mice were anesthetized by isoflurane inhalation and blood (500  $\mu\text{L}$ ) was collected by intracardiac puncture using syringe coated with 200 IU heparin. Right femurs were fixed for at least 48 hours in 10% phosphate-buffered formaldehyde (Burckhardt's solution) for further  $\mu\text{CT}$  and histomorphometry analysis. Hypoxia physiological activity was validated by quantification of BFU-E (burst forming unit-erythroid) colonies in spleen, reticulocytes in blood and levels of plasma erythropoietin (EPO) by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The



physiological consequences of hindlimb unloading were confirmed by measurements of the bone volume/tissue volume ratio (BV/TV), the osteoblast surface/bone surface ratio (Ob.S/BS) and the osteoclast number/bone surface (Oc.N/BS) in the femoral cancellous bone region of the secondary metaphyseal area.

### **Bone defect surgery and tissue sample collection**

After one week of habituation, mice were anesthetized by intraperitoneal (i.p.) injection of ketamine hydrochloride (60 mg/kg body weight) and medetomidine (0.5 mg/kg body weight). Then, a skin incision and a blunt dissection of the quadriceps were performed on the right shaved hindlimb to expose the metaphyseal region of the distal femur. Using an electric drill, a unilateral 0.9 mm diameter hole was created through the anterolateral cortical bone into the metaphyseal cancellous bone marrow until to reach the opposite cortical wall. Incised muscles and skin were closed with suture and mice were allowed to recover from anesthesia after an intramuscular injection of atipamezole (1mg/kg body weight). Analgesia was provided to mice through subcutaneous (s.c.) injections of buprenorphine (50 µg/kg body weight) 2 hours after surgery and twice a day for three consecutive days. Mice were randomly assigned to four groups of animals to assess the effect of hypoxia and suspension alone or in combination on bone repair processes. Each experiment was performed in duplicate (n = 2 x 5 mice per group). The four different experimental groups (Figure 1) are described below:

(i) Normoxic Control group (NC): Mice were kept under normoxic conditions ( $FiO_2 = 21\%$ ) until the day of sacrifice;

(ii) Normoxic Suspended group (NS): Following the post-surgery analgesic treatment (post-surgery day 4), mice were subjected to hindlimb unloading for 7 days under normoxic conditions ( $FiO_2 = 21\%$ );

(iii) Hypoxic Control group (HC): The last four days before sacrifice, mice were housed into a hypoxic chamber at 50 kPa ( $FiO_2 = 10\%$ );

(iv) Hypoxic Suspended group (HS): At post-surgery day 4, animals were subjected to hindlimb unloading for 7 days and the last four days of suspension, mice were transferred into a hypoxic chamber at 50 kPa ( $FiO_2 = 10\%$ ).

All animals were sacrificed on post-surgery day 11 under isoflurane anesthesia. Blood samples (about 500  $\mu$ l) were collected by intracardiac puncture with a syringe coated (for CFU assays) or not (for serum preparation) with 200 UI sodium heparin. Spleen was rapidly homogenized for CFU assays. Both right injured and left contralateral femurs were either immediately flushed for CFU assays and proteome analysis or fixed for at least 48 hours in 10% phosphate-buffered formaldehyde (Burckhardt's solution) for further  $\mu$ CT and histomorphometric measurements.

### **Blood reticulocyte quantification**

Heparinised blood was mixed with a ready-to-use brilliant cresyl blue solution (ref 1.01384.10100 from Merck) in a 1:1 (volume/volume) ratio and incubated for 30 min at 37°C. A blood smear was prepared on glass slide and blue stained- reticulocytes were counted under a Leica Aristoplan light microscope equipped with a Sony DXC-930P color video camera connected to semi-automatic image analyzer software (Histolab; Microvision; France).

### **Levels of plasma EPO by Elisa immunoassay technique**

EPO concentration was measured in plasma (heparinised blood centrifuged for 20 min at 2000g) using a mouse EPO Elisa immunoassay kit (kit MEP00B from R&D Systems) as specified by the manufacturers.

### **CFU assays**

Clonogenic hematopoietic progenitor cells (HPC) were quantified in blood, spleen and femurs collected from a same animal by performing colony-forming unit assays in semi-solid media. For this purpose, spleen was homogenized with a potter in 1 mL IMDM medium (Gibco) + 1x PSN (1x penicillin-streptomycin-neomycin; Gibco). Using a syringe with a 26 gauge needle, BM was flushed from both femurs with 1 mL IMDM medium + 1% PSN. Then, homogenized-spleen, bone marrow or heparinised-blood were diluted in 4 volumes of lysis buffer (155 mM NH<sub>4</sub>Cl; 10 mM sodium bicarbonate; 0.1 mM EDTA; pH 7.4) and red blood cell lysis was carried out for 15 min at +4°C. After a 10 min centrifugation at 350g, nucleated cells were washed twice with phosphate buffered saline (1x PBS) + 0.5% bovine serum albumin (BSA). Cells were resuspended in 200 µL (blood) or 1 mL (spleen and bone marrow) IMDM medium + 1% PSN and an aliquot was diluted in 1/35 acetic acid for cell counting on Kova slides (Kova international, CA, USA) under microscope. Finally,  $4 \times 10^4$  (bone marrow) or  $4 \times 10^5$  (blood and spleen) nucleated cells were mixed with Methocult M3434 (StemCell Technologies; France) according to the supplier's instructions. The mixture was plated in duplicate in 35x10 mm Petri dishes (ref: 35-1008 Beckton Dickinson) and hematopoietic colonies were allowed to grow for 7-14 days in an incubator at 37°C with 5% CO<sub>2</sub> and 95% humidity. A mix of myeloid progenitors including CFU-M (colony forming unit-macrophage),

CFU-G (colony forming unit-granulocyte) and CFU-GM (colony forming unit-granulocyte-macrophage) colonies was counted under an inverted light microscope.

The number of BM MSCs was estimated in both injured and contralateral femurs by performing CFU-F (colony forming unit-fibroblast) assays. For this purpose, femoral BM was flushed with a 26-gauge needle-equipped syringe containing 1 mL  $\alpha$ MEM (Gibco-Invitrogen) + 2% v/v MSC-qualified fetal bovine serum (FBS) + 1x PS (1x penicillin-streptomycin; Gibco-Invitrogen). An aliquot of BM homogenate was diluted in 1/35 acetic acid for cell counting on Kova slides under microscope. Then,  $1 \times 10^6$  nucleated cells were seeded into 6-well plates (ref: 353046; Falcon) and cultured for 12-14 days in 2 mL  $\alpha$ MEM + 10% MSC-qualified FBS + 1x PS in an incubator at 37°C (with 5% CO<sub>2</sub> and 95% humidity). The culture medium was changed every 3 days. At the end of the culture, cells were stained with May-Grundwald-Giemsa dye (Hemacolor kit; Merck) according to supplier's instructions. CFU-F colonies (only colony with at least 50 cells) were counted under a binocular stereo microscope.

### **X-ray microtomography ( $\mu$ CT) and histomorphometry**

Formaldehyde-fixed femurs were positioned vertically in the sample chamber and scanned with a SkyScan 1174 v.2  $\mu$ CT device (SkyScan; Belgium) using a 180° tomographic rotation scanning (rotation step = 0.3°) at an isotropic resolution of 6.74  $\mu$ m. All femurs were scanned with a 50 kV X-ray source voltage, a 800  $\mu$ A current and a 0.5 mm aluminium filter. All scans were 3D reconstructed and analyzed with the same parameter setup (Nrecon v.1.6 and CTan v.1.11 softwares; SkyScan; Belgium) in order to separate mineralized elements from background using the software histogram tool to threshold grey level values. In the validation step of tail suspended mouse model, bone mass defined as the BV/TV was quantified in the cancellous bone region located in the secondary metaphyseal area of the

distal end of the femur in a standardized zone positioned 100  $\mu\text{m}$  below the growth cartilage and 100  $\mu\text{m}$  from the cortices. To estimate bone repair efficiency in lesioned femurs, two regions of interest (ROI) were delineated by freehand drawing from the same investigator to measure the closing of the cortical defect and the filling of the medullary cavity (lesion area) with trabecular new bone. The first ROI was a 0.9 mm diameter (hole diameter obtained with the drill) and 0.3 mm thick cylinder positioned between the edge of the cortical defect. The surface of newly formed bone dedicated to the closing of the cortical defect was measured and compared to the surface of the initial hole surface (calculation of the percentage of the cortical defect closing). The second ROI was bordered by the defect boundaries in the medullary cavity and encompassed regions containing newly formed bone, excluding the first ROI. In this second ROI, bone volume fraction of the newly mineralized elements defined as the BV/TV was measured.

After  $\mu\text{CT}$  scanning, formaldehyde-fixed femurs were successively dehydrated in ethanol and xylene and then, embedded in Technovit<sup>®</sup> resin without decalcification. Five  $\mu\text{m}$  longitudinal sections were prepared with a Leica 2055 microtome equipped with a tungsten carbide blade. Sections were stained with Masson-Goldner trichrome dye and bone static parameters such as Ob.S/BS, Oc.N/BS and adipocyte number (Ad.N/ $\text{mm}^2$ ) were measured under blind conditions using a Leica Aristoplan microscope connected to a Sony DXC-930P color video camera and a semi-automatic image analyzer software (Histolab; Microvision France). In femur from mice free of any bone defect and dedicated to the validation of tail suspended mouse model, Ob.S/BS and Oc.N/BS were measured in the secondary metaphyseal area. In lesioned femurs, measurements of bone static parameters (Ob.S/BS, Oc.N/BS and Ad.N/ $\text{mm}^2$ ) were performed in the medullary cavity (lesion area). For each

femur, histomorphometric parameter values were measured in three different non adjacent sections and averaged.

### **Protein analysis in bone marrow homogenates**

Levels of various proteins involved in endothelial/hematopoietic/mesenchymal progenitor commitment were determined in lesioned femur BM homogenates using an array-based multiplex sandwich Elisa from Ray Biotech (Norcross, GA, USA). Briefly, lesioned femurs were flushed with a syringe (26 gauge needle) containing 500  $\mu$ L IMDM + 1% PSN and then BM homogenates were centrifuged for 10 min. at 350g and +4°C. The resulting supernatant was used for the BM homogenate protein analysis. Supernatant samples (50  $\mu$ L) were loaded onto array slides designed with implanted capture antibodies raised against Dkk1 (Dickkopf-1), HGF (hepatocyte growth factor), MIP-1 $\alpha$  (macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$ ), SDF-1 (stromal cell-derived factor-1) and VEGF (vascular endothelial growth factor). Fluorescence-based quantification was performed by incubating array slides with HyLite plus<sup>TM</sup>555-labeled detection antibody and by further laser scanner reading with an Agilent G2505B microarray scanning device and Q-analyzer software analysis. This proteome analysis experiment was subcontracted by Tebu-Bio (Le Perray-en-Yvelines, France).

### **Statistical analysis**

All data are expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM). In mice free of any bone defect used to validate hypoxia and hindlimb unloading experimental models, a *t*-test was carried out to assert statistical difference between C and H groups (hypoxia model) or C and S groups (tail suspension model) for a given parameter. In mice subjected to bone defect, the influence of both hypobaric respiratory hypoxia and hindlimb unloading on the

different measured parameters was statistically analysed by two-way ANOVA tests. For CFU assays, a paired two-way ANOVA test was used to compare the influence of both hypoxia and tail suspension between contralateral and lesioned femurs collected from a same animal. Whenever ANOVA yielded significant interaction difference, a Newman-Keuls post-hoc test was thus performed. For all statistical tests (Statview software; SAS institute Inc.; Cary NC; USA), the significance level was set at  $p < 0.05$ .

## RESULTS

### **Validation of hypobaric hypoxia and hindlimb unloading experimental murine models**

In mice free of any bone defect, 4 days of hypobaric respiratory hypoxia (Figure 2A) produced a massive augmentation in spleen BFU-E (6.4 fold increase;  $p < 0.001$ ) and blood reticulocyte (3.9 fold rise;  $p < 0.01$ ) numbers as well as in plasma EPO level (4.0 fold augmentation;  $p < 0.001$ ). This indicates that the hypoxic condition applied to our mice strongly enhanced erythropoiesis.

Seven days of hindlimb unloading in mice triggered a significant diminution of both BV/TV (-26%;  $p < 0.05$ ) and Ob.S/BS (-22%;  $p < 0.05$ ) combined with an enlargement of Oc.N/BS (+26%;  $p < 0.01$ ) in the femoral metaphyseal area (Figure 2B). These static bone parameter modifications are typically encountered in the context of bone loss.

All these changes in hematological or bone metabolism parameters thus validated our experimental murine models of hypoxia or hindlimb unloading, respectively.

### **Hypoxia increases bone healing efficiency without any consequence of tail suspension**

Bone healing efficiency was assessed by evaluating the closing of the cortical defect and the filling of the medullary cavity (BV/TV parameter) with trabecular new bone using  $\mu$ CT measurements (Figure 3A).

As shown in figure 3B, ANOVA revealed a significant effect of hypobaric hypoxia ( $p = 0.002$ ) on the closing of the cortical defect without any influence of hindlimb unloading ( $p = 0.282$ ) and without any interaction between hypoxia and unloading (hypoxia x unloading interaction;  $p = 0.437$ ). When compared with mice housed in normoxic conditions (NC+NS



groups), 4 days of hypoxia induced a +55% increase in the efficiency of cortical defect closing, independently of the tail suspended/unsuspended status (HC+HS groups).

Similarly, ANOVA evidenced a significant effect of hypoxia ( $p = 0.001$ ) on the medullary cavity BV/TV (Figure 3C) without any influence of unloading ( $p = 0.703$ ) and hypoxia x unloading interaction ( $p = 0.665$ ). The filling of the medullary cavity with newly mineralized bone was augmented by +35% in mice subjected to hypoxic conditions associated or not with hindlimb unloading.

### **Hypoxia or tail suspension differently modulate static bone parameters**

To better understand physiological events underlying hypoxia-improved bone healing, static bone parameters such as Ob.S/BS, Oc.N/BS and Ad.N/mm<sup>2</sup> were quantified in the medullary cavity of lesioned femurs using histomorphometry measurements.

Concerning Ob.S/BS (Figure 4A), ANOVA indicated a hypoxia influence ( $p = 0.002$ ) on this parameter without any effect of hindlimb unloading ( $p = 0.805$ ) and hypoxia x unloading interaction ( $p = 0.214$ ). As compared to normoxic mice (NC+NS groups), hypobaric respiratory hypoxia (HC+HS groups) produced a -31% decrease in Ob.S/BS.

ANOVA revealed a hypoxia effect ( $p = 0.005$ ) on Oc.N/BS (Figure 4B) without any consequence of tail suspension ( $p = 0.690$ ) and hypoxia x suspension interaction ( $p = 0.156$ ). Compared with normoxic mouse groups (NC+NS), four days of hypoxia amplified Oc.N/BS by a significant +16% when applied alone or in combination with tail suspension (HC+HS groups).

Contrariwise to both osteoblast and osteoclast numbers which are exclusively influenced by hypoxia, adipocyte quantities in the medullary cavity were only modified by tail suspension (Figure 4C). Indeed, ANOVA demonstrated a significant influence of tail

suspension ( $p = 0.0006$ ) on the Ad.N/mm<sup>2</sup> bone static parameter without any influence of hypobaric hypoxia ( $p = 0.121$ ) and without any hypoxia x suspension interaction ( $p = 0.221$ ). Independently of the normoxic/hypoxic status, tail suspension induced a massive +82% enlargement of the adipocyte density in the medullar cavity (NS+HS versus NC+HC groups).

### **Hypoxia and tail suspension behave differently on bone marrow HSC and MSC mobilization**

Since hypoxia produced a reduction in Ob.S/BS combined with a rise in Oc.N/BS, we quantified bone marrow osteoprogenitor cells yielding to osteoblast and osteoclast after differentiation. Quantities of MSCs (osteoprogenitor cells for Ob) and myeloid-derived HSCs (Oc originates from both CFU-GM and CFU-M) were estimated using clonogenic assays. To evidence the role and the mobilization of these osteoprogenitor cells in bone repair process, MSCs and myeloid-derived HSCs (added numbers of CFU-GM, CFU-M and CFU-G) were numbered in both lesioned and contralateral femurs. Myeloid-derived HSCs were also quantified in blood and spleen.

For MSCs in both lesioned and contralateral femurs (Figure 5), paired two-way ANOVA analysis showed a variation in CFU-F colony numbers between contralateral and lesioned femurs ( $p = 0.001$ ) and a global effect of hindlimb unloading on CFU-F colony quantities in both femurs ( $p = 0.034$ ). The number of MSCs in lesioned femurs was +45% higher than MSC quantity in contralateral femurs whatever the considered experimental group (lesioned NC+NS+HC+HS versus contralateral NC+NS+HC+HS groups). As shown in figure 5, hindlimb unloading associated or not with hypoxic conditions induced a global -29%

decrease in bone marrow CFU-F colony numbers, independently of the considered femur (lesioned and contralateral NC+HC versus lesioned and contralateral NS+HS groups).

For bone marrow myeloid-derived HSCs (Figure 6A), paired two-way ANOVA analysis evidenced an influence of hypobaric respiratory hypoxia on HSCs colony quantities ( $p = 0.037$ ) with a femur laterality x hypoxia interaction ( $p = 0.037$ ) indicating a different hypoxia effect between lesioned and contralateral femurs. In contralateral femurs, hypoxia produced an important -48% reduction in myeloid-derived HSCs (NC+NS versus HC+HS groups) while the amount of these progenitors remained unchanged in lesioned femurs. This dramatic drop in contralateral femur myeloid-derived HSCs under hypoxic challenging would suggest a massive escape of these progenitors from intact bones into blood circulation.

To evaluate such a hypothesis, myeloid-derived HSCs were also quantified in circulating blood and spleen of NC, NS, HC and HS mice. In these two hematopoietic organs, ANOVA revealed an effect of hypoxia ( $p = 0.012$  for blood and  $p < 0.001$  for spleen) on myeloid-derived HSCs without any influence of hindlimb unloading ( $p = 0.205$  for blood and  $p = 0.956$  for spleen) and hypoxia x unloading interaction ( $p = 0.305$  for blood and  $p = 0.742$  for spleen). Compared with normoxic mice (NC+NS groups), 4 days of hypoxia triggered a massive enlargement of myeloid-derived HSCs in blood (6.8 fold increase; Figure 6B) and in spleen (9.9 fold augmentation; Figure 6C), independently of the suspended/unsuspended status (HC+HS groups). This result argued in favor of a huge HSC mobilization from intact bones into blood and spleen under hypoxic conditions.

**Secretome analysis allows identifying molecules participating in hypoxia-enhanced bone healing**

We quantified levels of Dkk-1, HGF, Mip-1 $\alpha$ , SDF-1 and VEGF in the BM of lesioned femurs (Figure 7). These factors are involved in different stages of endothelial/hematopoietic/mesenchymal progenitor fate and their level variations can give valuable information on mechanism implicated in bone fracture repair in our animal models.

SDF-1 is one of the factors modulating HSC and MSC mobilization. Both hypoxia and tail suspension failed to change SDF-1 level in the BM of lesioned femurs ( $p = 0.096$  for hypoxic effect and  $p = 0.621$  for hindlimb unloading influence).

Dkk-1 is involved in the regulation of bone metabolism balance and its level decline either in blood or bone marrow is associated to an augmentation in bone mass and bone healing efficiency. ANOVA indicated a significant influence of hypoxia ( $p = 0.010$ ) on this factor (Figure 7A) without any effect of tail suspension ( $p = 0.847$ ) and hypoxia x unloading interaction ( $p = 0.674$ ). Hypoxia produced a -35% reduction in Dkk-1 level (NC+NS versus HC+HS groups) arguing in favor of a bone healing enhancement.

Mip-1 $\alpha$ , a pro-inflammatory cytokine promoting osteoclastogenesis, was only modified by hypoxia, independently of the loading/unloading status (ANOVA analysis with  $p = 0.020$  for hypoxic effect;  $p = 0.214$  for suspension influence; no hypoxia x suspension interaction with  $p = 0.482$ ). Hypoxia increased MIP-1 $\alpha$  level by +55% (NC+NS versus HC+HS groups) indicating that osteoclastogenesis is favored in the lesioned femur of hypoxic animals by the time of the sacrifice (Figure 7B).

HGF (Figure 7C) and VEGF (Figure 7D) levels exhibited similar alteration patterns when our mice were subjected to hypobaric hypoxia and/or hindlimb unloading. ANOVA revealed an effect of both hypoxia ( $p = 0.015$  for VEGF and  $p = 0.001$  for HGF) and tail suspension ( $p < 0.001$  for VEGF and  $p = 0.003$  for HGF) on VEGF and HGF levels without any hypoxia x suspension interaction ( $p = 0.303$  for VEGF and  $p = 0.153$  for HGF). VEGF and HGF

concentrations decreased by -41% and -53% under hypoxia, respectively (NC versus HC groups). Tail suspension induced a -63% and a -49% reduction in VEGF and HGF levels, respectively (NS versus HS groups). A cumulative drop of the concentrations of these two factors was observed when both hypoxia and hindlimb unloading were applied to our bone defect mouse model (-81% and -73% drop for VEGF and HGF, respectively when TN group is compared with HS group). These data evidenced that both hypoxia and tail suspension negatively impacted the quantity of these two multifunctional cytokines.

## DISCUSSION

In the field of orthopaedic surgery, cell therapy is believed to be a promising approach to circumvent bone graft limitations in the healing process of non-union and delayed union bone defects. Cell therapy would aim at stimulating host's natural healing response by providing additional MSC- and HSC-derived osteoprogenitor cells to the sites of bone healing (Bielby, Jones et al. 2007; Rao and Stegemann 2013). One of the emerging developed approaches relies on the direct *in vivo* mobilization of endogenous MSC- and HSC-derived osteoprogenitor cells from bone marrow to the bone lesion area. The *in vivo* osteoprogenitor mobilization is obtained either by the injection of specific growth factors or by subjecting animal models to environmental conditions prone to favor HSC and MSC mobilization.

Based on the ability of hypobaric hypoxia to stimulate both HSC and MSC mobilization (Rocheffort, Delorme et al. 2006; Li, Huang et al. 2011; Liu, Yu et al. 2011), the goal of the present study was to answer the question if whether or not delayed onset in hypobaric hypoxia treatment could efficiently improved bone healing via the enhancement of *in vivo* stem cell mobilization. Additionally, we evaluated the impact of tail suspension - a condition known to be detrimental to osteoblast-driven bone formation – as an attempt to mimic human plaster cast immobilization in our rodent experimental model.

As a breakthrough contribution, we clearly demonstrated in the study presented herein that hypobaric hypoxia enhanced bone healing process in mice model subjected to a drill-hole bone defect. Indeed, valuable improvements in the cortical defect closing and in the filling of the medullary cavity with newly formed bone were observed when our mice were subjected to a 50 kPa hypobaric hypoxia ( $FiO_2 = 10\%$ ) during the last 4 days of an 11

day post-surgery recovery period. In opposition to our data, Makley et al. (Makley, Heiple et al. 1967) demonstrated in a rat model of fibula fracture subjected to chronic hypobaric hypoxia that the efficiency of bone repair is impaired. This observation was confirmed by a recent investigation (Lu, Saless et al. 2013). In the context of bone repair, these investigators demonstrated that 10 days of hypoxia ( $FiO_2 = 13\%$ ) decreased bone formation and delayed callus remodeling in a mouse model of tibial closed transverse mid-diaphyseal fractures stabilized or not with external fixator (Lu, Saless et al. 2013). However, the onset of the hypoxic treatment could explain the discrepancy between our data and the results presented by Makley (Makley, Heiple et al. 1967) or Lu (Lu, Saless et al. 2013). Indeed, in both studies mice were housed in the hypoxic chamber during all the recovery period between the bone lesion surgery and the sacrifice times while our hypoxic mice were housed for 7 days in normoxic conditions prior to be transferred in the hypoxic chamber for a four day period (sacrifice at post-surgery day 11). Thus, we suggest that the onset time for the hypoxic treatment delivery after the bone lesion surgery differently orientates the efficiency of hypoxia on the bone healing process.

As a matter of interest, the decrease of Dkk1 observed in the BM of our bone defect animal model is consistent with the improvement of bone healing efficiency under hypoxic condition. Indeed, heterozygous Dkk1-deficient mice exhibited a marked enlargement in bone mass associated to increased mineral apposition rate and bone formation with no change in bone resorption (Morvan, Boulukos et al. 2006). Furthermore, Dkk1 antibody delivery in growing and adult rodents subjected to bone fractures improved repair efficiency and biomechanical strength properties at the fracture callus (Liu, Yu et al. 2011).

Our data also evidenced the absence of any detrimental effect of hindlimb unloading on the bone healing efficiency in both our normoxic and hypoxic mice. It is widely

acknowledge that tail suspension favors bone resorption in association with bone mass loss in rodent free of any bone defect. This bone resorption mechanism is the result of a sustained loss of osteoblast progenitors (Visigalli, Strangio et al. 2010; Shahnazari, Kurimoto et al. 2012) combined with an acute but transient rise in osteoclast precursors (Shahnazari, Kurimoto et al. 2012). In our bone defect mouse model, it can be assumed that the osteoblast-bone formation process induced by the bone healing mechanism supplants the detrimental bone resorption activity typically triggered by the tail suspension. In the context of a clinical orthopaedic application, it can be extrapolated that immobilization of the injured limb set to the patient would probably not disturb the efficiency of the hypoxic-improved bone healing process.

In a second set of experiments, we addressed the cellular/physiological pathways underlying the effects of hypoxia and tail suspension in bone healing mechanisms. Since osteoblasts and osteoclasts originate from MSC and HSC respectively, we quantified these two types of progenitor cells in the BM of lesioned and contralateral femurs to address the question if whether or not hypoxia-improved bone repair could be related to an enhanced MSC and/or HSC mobilization.

Concerning hematopoietic progenitors in our animal model, hypoxia induced an important decrease in myeloid-derived HSCs in contralateral femurs associated with a massive enlargement of the quantity of these progenitors in blood and spleen. Our results clearly demonstrated a massive mobilization of myeloid-derived progenitors from undamaged bones (including contralateral femurs) into the blood circulation under hypoxic conditions. These results are consistent with previously published data on hypoxia-induced hematopoietic progenitor mobilization in rodent free of any bone defect (Rocheffort, Delorme et al. 2006; Li, Huang et al. 2011). Indeed, 1 or 2 weeks of hypoxic exposure



reduced granulocyte-macrophage progenitors in bone marrow of rat (Li, Huang et al. 2011) while a chronic hypoxia increased blood circulating granulocyte-macrophage progenitor numbers (Rochefort, Delorme et al. 2006). In contrast, the number of myeloid-derived hematopoietic progenitors in lesioned femurs remained unmodified under hypoxia. It can be, however, hypothesized that these progenitors were mobilized from undamaged bones to the lesioned femurs. Nevertheless, when engrafted in the lesioned areas, these myeloid derived progenitors did not accumulated but are immediately included in the osteoclastogenesis process. Indeed, it is well known that osteoclast derived from fusion of monocytes transported into bones via the vascularisation.

The accumulation of MIP-1 $\alpha$  in the BM of our hypoxic mice is consistent with this hypothesis of an accelerated osteoclastogenesis in the medullary cavity of our hypoxic animals compared to their normoxic counterparts. MIP-1 $\alpha$  (also called CCL3), is a pro-inflammatory cytokine involved in the regulation of growth and differentiation of hematopoietic cells and osteoclastic progenitors. MIP-1 $\alpha$  was found to promote osteoclastic differentiation of mouse C7 osteoclastic progenitor cell line (Tsubaki, Kato et al. 2007). Interestingly, absence of mechanical solicitations triggered by tail suspension failed to modify the influence of hypoxia on myeloid-derived progenitor fate and BM MIP-1 $\alpha$  levels.

Concerning MSC, our data clearly indicates that the number of these progenitors is more important in the lesioned femurs rather than in contralateral femurs whatever the considered animal model groups. Furthermore, both in normoxic and hypoxic mice, hindlimb unloading reduced MSC quantities in lesioned and contralateral femurs. The larger number of MSC in lesioned femurs as compared to contralateral femurs could be explained by a specific MSC mobilization from undamaged bones (including contralateral femurs) to the lesioned femurs via blood vessels. Such a MSC mobilisation is proven to contribute to bone

healing process (Kumagai, VasANJI et al. 2008; Granero-Molto, Weis et al. 2009; Pignolo and Kassem 2011). Using parabiotic mice formed by surgically conjoining GFP-expressing mice and syngeneic wild-type mice, Kumagai et al. (Kumagai, VasANJI et al. 2008) elegantly demonstrated that circulating GFP-positive osteogenic progenitors from transgenic animals were mobilized to bone lesion site in syngeneic wild-type mice, thus contributing to osteogenesis. In another investigation, luciferase-expressing MSCs were intravenously injected to mice exhibiting stabilized tibial fracture and bioluminescence was performed to show that transplanted MSCs preferentially migrated to the fracture site to improve bone repair (Granero-Molto, Weis et al. 2009). In our animal model, we can thus legitimately postulate that endogenous MSCs are mobilized from intact bones (including contralateral femur) to the lesioned femurs in order to contribute to bone healing. However, the absence of an expected MSC mobilization enhancement by hypoxia in our animal model could appear to be disappointing since this environmental condition is prone to favour MSC mobilization in rodent free of any bone defect (Rochefort, Delorme et al. 2006; Liu, Yu et al. 2011). Indeed, short-term and chronic hypobaric hypoxia induced MSC mobilization into peripheral blood of rodents in a time-dependent manner (Rochefort, Delorme et al. 2006; Liu, Yu et al. 2011) and this event is triggered by HIF-1 $\alpha$  and SDF-1 activation (Liu, Yu et al. 2011). SDF-1 is also involved in the recruitment of MSC to the fracture site during skeletal repair in mice (Kitaori, Ito et al. 2009). Our proteome analysis confirmed the absence of a hypoxia-induced MSC mobilization in our mice since SDF-1 levels in the BM of lesioned femurs is not modified by hypoxia in our animal model, independently of the loaded/unloaded status (data not shown). Nevertheless our data can be explained when reported to the kinetics of the bone repair process. As discussed above, our hypoxic treatment is assumed to accelerate bone healing and by the time of sacrifice an osteoclast-enhanced bone resorption pattern is

predominant in the femoral medullary cavity while osteoblast-driven bone formation is declining. Therefore, the extensive need of osteoblasts into the fracture site is over and then it can be hypothesized that the mobilization of osteoprogenitors is reduced explaining the absence of hypoxia influence on MSC number and SDF-1 levels in bone marrow.

The MSC number drop evidenced in our tail suspended animals subjected to femoral fracture is consistent with previously published data on the influence of hindlimb unloading on rodent bone metabolism (Shahnazari, Kurimoto et al. 2012). Indeed, experiments based on *in vitro* calcified nodule formation evidenced that the amount of MSCs in BM from both C57/BL6 and DBA/2 mice dramatically dropped following one week of hindlimb suspension onwards (Shahnazari, Kurimoto et al. 2012). As assessed by histomorphometric measurements in the medullary cavity of the lesioned femurs, we evidenced an influence of hypoxia on osteoblast (Ob.S/BS) and osteoclast (Oc.N/BS) numbers while tail suspension effect was restricted to adipocyte numbers (Ad.N/mm<sup>2</sup>). Interestingly, 7 days of hindlimb unloading induced an increase in adipocyte numbers indicating that despite the extensive need of osteoprogenitors in the lesion area to promote bone repair, tail suspension preferentially triggered MSC differentiation into adipocytes rather than into osteoblasts as usually observed in suspended mice free of any bone defect. Furthermore, hypoxia enlarged osteoclast numbers concomitantly with a drop in the amount of osteoblast in the medullary cavity. Such a bone metabolism unbalance is usually associated to bone resorption and bone mass loss, a data which seems contradictory to the hypoxia-enhanced bone healing pattern evidenced in our animal model. However, a hypothesis based on the kinetics of mechanisms implied in the repair of drill-hole bone defect can explain our results. According to previously published data (Uusitalo, Rantakokko et al. 2001; He, Zhang et al. 2011), the repair of a drill-hole cortical bone defect in mice is associated to a transitory synthesis of newly woven bone

in the intra-medulla region, peaking between 7 and 14 days after surgery as assessed by  $\mu$ CT measurements (BT/TV) and histology analysis. In addition, quantifications of specific bone formation and resorption markers/mRNA levels revealed that osteoblast activity peaked at post-surgery day 10 while osteoclast activity peaked at post-surgery day 14 (Uusitalo, Rantakokko et al. 2001; He, Zhang et al. 2011). In our study, mice were sacrificed on post-surgery day 11 corresponding roughly to the peak of the osteoblast activity and the beginning of the osteoclast activity in the medullary cavity as described by Uusitalo and He teams'. Thus, if we hypothesized that the bone healing improvement evidenced in our hypoxic mice is due to an acceleration of the repair process, then a temporal shift of osteoblast/osteoclast activity peaks is expected. In this case, at post-surgery day 11, the osteoclast activity peak is already reached in our hypoxic mice while osteoblast activity is declining by now.

The measurement of VEGF and HGF also supports our hypothesis of an accelerated bone repair in our hypoxic conditions. VEGF is an endothelial cell survival factor well known to promote angiogenesis while HGF is a multifunctional cytokine that regulates proliferation, migration, differentiation and survival of a wide variety of cells. The level of these 2 cytokines similarly decreases in BM when either hypoxia or hindlimb unloading are applied to our bone defect animal model. The drop level for both VEGF and HGF is cumulative when hypoxia is combined with tail suspension. The detrimental influence of hypoxia on BM VEGF level in our animal model could appear to be unexpected since VEGF over-expression is observed in mice subjected to hypoxia (Maes, Carmeliet et al. 2012). However, within the framework of our hypothesis whether the hypoxic treatment accelerates the bone healing process implying an earlier osteoclastogenesis onset for the resorption of the newly woven bone in the medullary cavity, thus, our data logically make sense. Indeed, neoangiogenesis is

an important early step in the fracture repair process (Uchida, Sakai et al. 2003). In drill-hole or non-union/union segmental bone defects in rodent both vascularization (Garcia, Pieruschka et al. 2012) and VEGF expression (Uchida, Sakai et al. 2003) increased within the first 7-11 days post-surgery with a subsequent decrease after 14 days (Uchida, Sakai et al. 2003; Garcia, Pieruschka et al. 2012). Thus, with an acceleration of the bone repair mechanism in our hypoxic mice, by the time of the sacrifice (post-surgery day 11), VEGF level has already decreased while it is not the case in normoxic animals yet. A similar observation can be put forward to explain our HGF data. HGF-enhanced activity occurred in MSCs around the fracture site during the early phase of the repair process (Imai, Terai et al. 2005). Thus, a decrease in BM HGF level argues in favour of a more advanced healing mechanism in our hypoxic mice. Furthermore, since HGF has been described as a strong chemoattractant for MSC (van de Kamp, Jahnke-Dechent et al. 2013), its level reduction paired up with a lesser need of MSC in lesion area at late bone repair process.

Concerning the effect of hindlimb unloading on BM levels of VEGF and HGF, very sparse data have been published to our knowledge. In a drill-hole bone defect model, rats subjected to 10 days hindlimb unloading exhibited less developed blood vessels than control rats (Matsumoto, Goto et al. 2013). It can be assumed that a low production of VEGF is correlated to the impairment of blood vessel development in the context of hindlimb unloading during bone healing process in rodent, thus explaining our results of decreased VEGF level in our tail suspended mice.

## **Conclusions**

In our drill-hole bone defect mouse model, only 4 days of hypoxia applied during remodelling process massively enhanced bone healing efficiency as assessed by  $\mu$ CT measurements of the cortical defect closing and the filling of the medullary cavity with trabecular new bone. Our proteome analysis and histomorphometry data suggested that the bone repair improvement could be due to an acceleration of the natural bone healing process. We also confirmed previously published studies showing that the bone repair mechanism involves a large mobilization of both MSC (osteoblast progenitors) and HSC (osteoclast progenitors) from undamaged bones into the lesioned femur via the blood circulation. However, by the time of the animal sacrifice (post-surgery day 11), hypoxia enhanced HSC mobilization but failed to modulate MSC recruitment. This improved HSC mobilization paired up with an enlargement of osteoclast number in the medullary cavity of the lesioned femur confirming the acceleration of the natural bone healing process under hypoxia. Indeed, in hypoxic animals, the osteoclastogenesis step leading to the destruction of the transitory trabecular bone in the medullary cavity is already engaged while it is not the case in normoxic mice yet. In accordance to the benefits brought by hypoxia on the bone repair process, when applied during the bone remodelling step as demonstrated in our present study, hypoxic treatment (hypobaric room) could be an alternative approach to heal delayed non-union fracture and/or pseudarthrosis in patients.

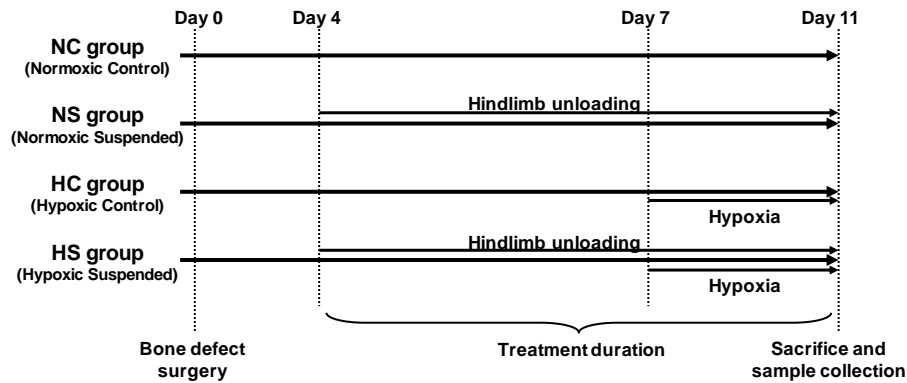
## **Acknowledgments**

The authors wish to thank (by alphabetical order) Catherine ANDRÉ, Dominique BONNEAU, Xavier BUTIGIEG, Bernadette GUERTON and Sylvie RENAULT for their valuable technical assistance in our laboratory. The authors are also grateful to Dr. Véronique

CHASTRES for her statistical expertise and Dr Adrienne ANGINOT for reading of the manuscript. The authors extend their thanks to Dr. Frances ASH for her helpful language assistance. This work was supported by a grant from DGA (Délégation Générale pour l'Armement; Grant PDH-1-SMO-0205 to Drs. Jean-Jacques LATAILLADE and Xavier HOLY) of the French Ministry of Defence.

### **Conflict of interest**

The authors declare that they have no conflict of interest.



**Figure 1: Design of the experimental groups**

After bone defect surgery (day 0), mice were randomly assigned to 4 different experimental groups:

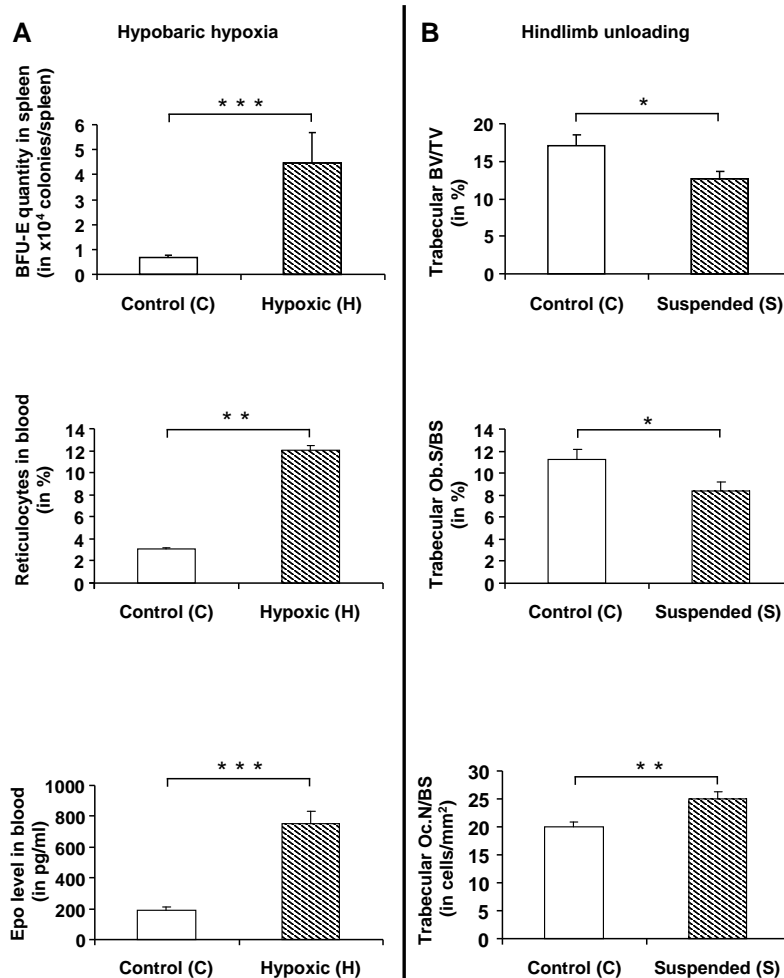
(i) Normoxic Control (NC) group: Mice were kept under normoxic conditions ( $FiO_2 = 21\%$ ) until the day of sacrifice (day 11);

(ii) Normoxic Suspended (NS) group: Mice were subjected to hindlimb unloading for 7 days (day 4 to day 11) under normoxic conditions ( $FiO_2 = 21\%$ );

(iii) Hypoxic Control (HC) group: Mice were housed into a hypoxic chamber at 50 kPa ( $FiO_2 = 10\%$ ) for the last 4 days before sacrifice (day 7 to day 11);

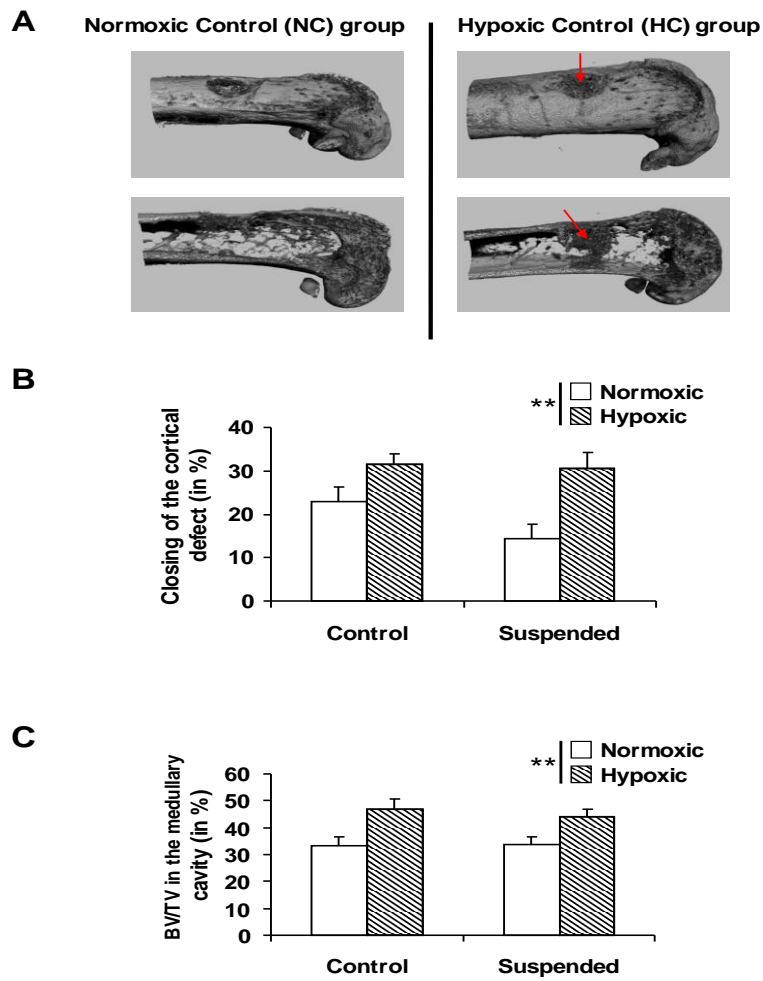
(iiii) Hypoxic Suspended (HS) group: Mice were subjected to hindlimb unloading for 7 days (day 4 to day 11) and were transferred into a hypoxic chamber at 50 kPa ( $FiO_2 = 10\%$ ) for the last 4 days of suspension (day 7 to day 11).





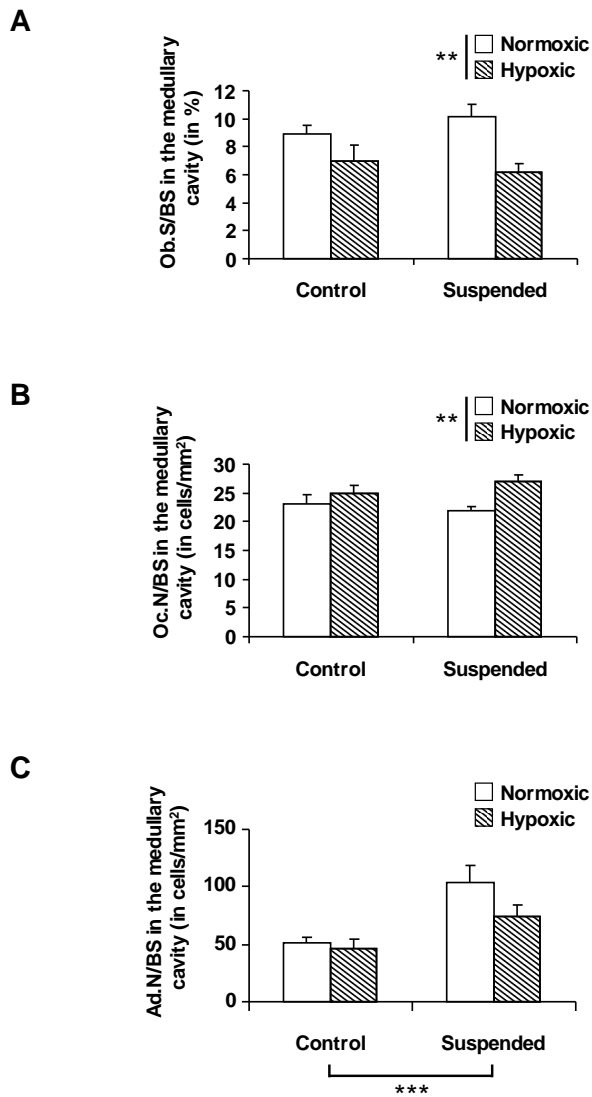
**Figure 2: Validation of the experimental murine models**

The effects of either 4 days of hypoxia or 7 days of hindlimb unloading were assessed in mice free of any bone defect. The hypoxia ability to enhance erythropoiesis was proven by measuring the numbers of spleen BFU-E and blood reticulocytes as well as the plasma EPO levels (panel A). For hindlimb unloading, the physiological influence of this environmental condition was validated by the measurements of histomorphometric static bone parameters in the femoral metaphyseal area including BV/TV, Ob.S/BS and Oc.N/BS (panel B). Statistical comparisons were performed using *t*-tests. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ .



**Figure 3: Bone repair efficiency measured by X-ray microtomography**

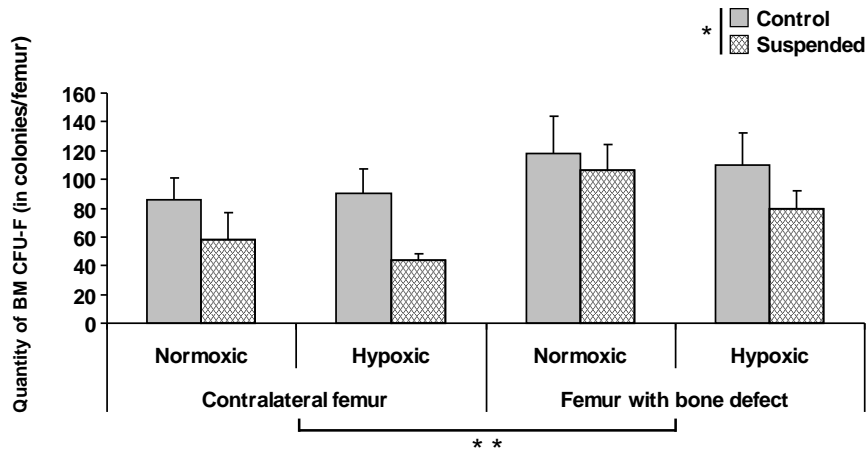
X-ray microtomography scanning pictures evidenced that 4 days of hypoxia improved bone healing efficiency in the cortical defect area (panel A). Quantitative measurements of the closing of the cortical defect (panel B) and the BV/TV in the medullary cavity (panel C) confirmed the enhanced bone repair process under hypoxia. Seven days of hindlimb unloading failed to modify bone healing efficiency. Statistical comparisons were carried out using 2-way ANOVA tests. \*\*  $p < 0.01$ .



**Figure 4: Measurements of histomorphometric bone parameters in the medullary cavity**

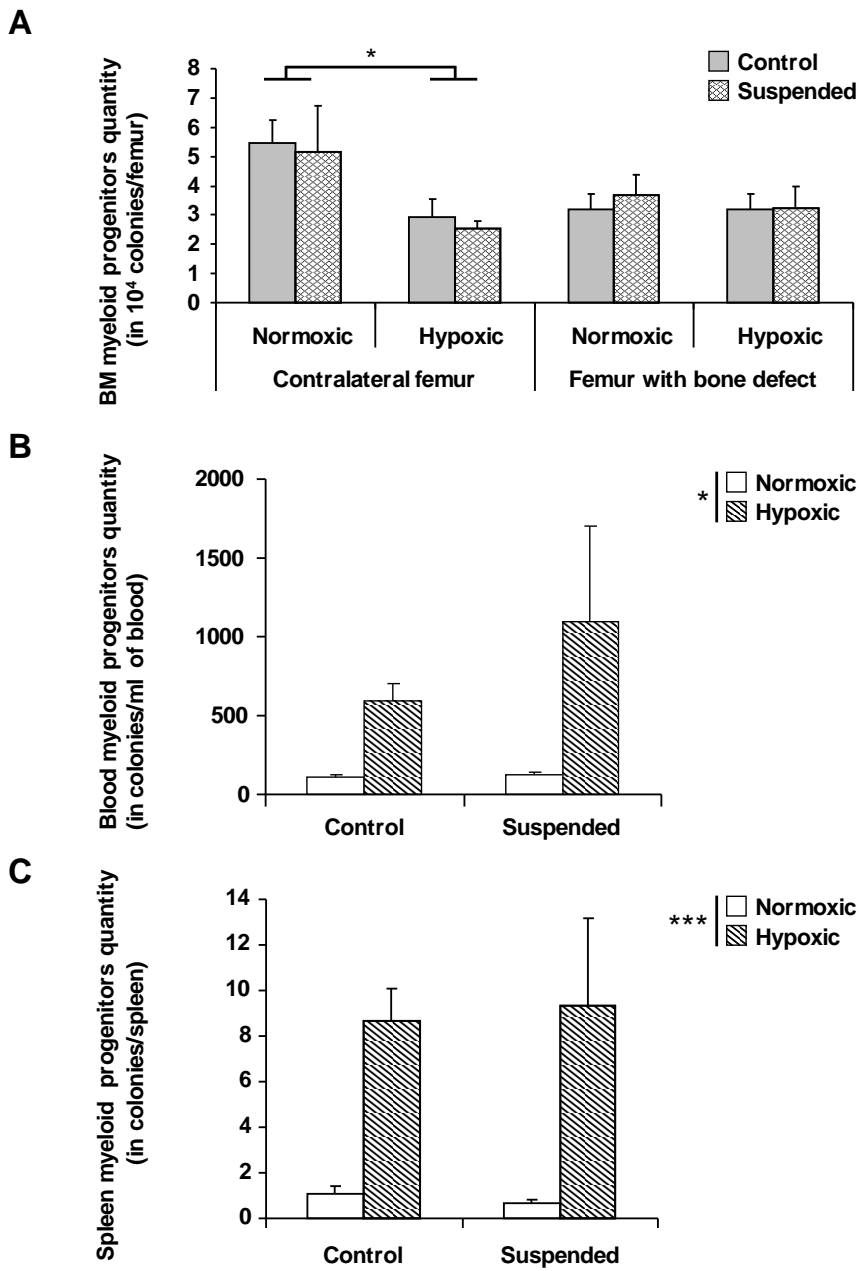
Masson-Goldner trichrome-stained bone sections were prepared to perform histomorphometry analysis in the medullary cavity of the lesioned femurs collected in our 4 experimental mouse model groups. Bone static parameters such as Ob.S/BS (osteoblast numbers; panel A), Oc.N/BS (osteoclast numbers; panel B) and Ad.N/mm<sup>2</sup> (adipocyte numbers; panel C) were measured under light microscope connected to a video camera and

a semi-automatic image analyzer software. Statistical comparisons were made using 2-way ANOVA tests. \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ .



**Figure 5: MSC quantification in lesioned and contralateral femurs**

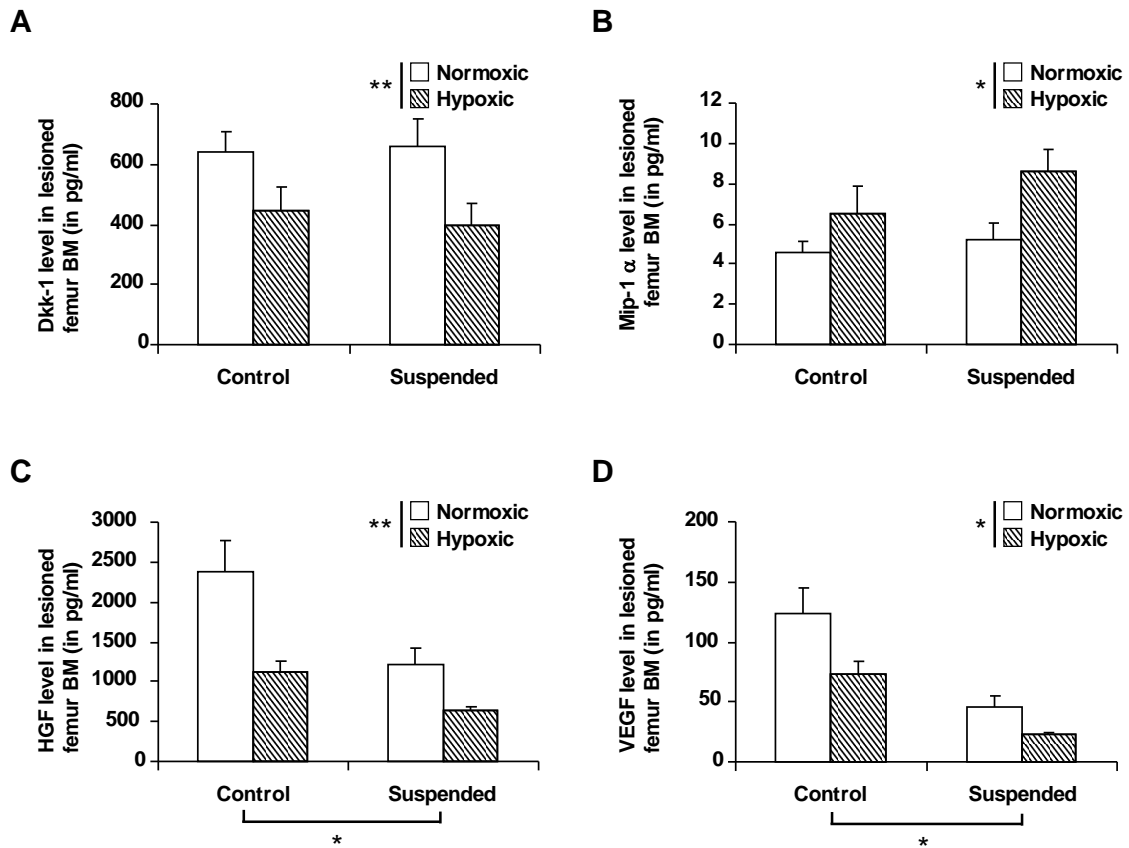
Bone marrow was flushed from lesioned and contralateral femurs collected from our 4 experimental mouse model groups. The numbers of bone marrow MSC (mesenchymal stem cells) was estimated by performing CFU-F (colony forming unit-fibroblast) assays. Paired two-way ANOVA tests and subsequent Newman-Keuls post-hoc tests were performed to compare the influence of hypoxia and tail suspension between contralateral and lesioned femurs. \*\*  $p < 0.01$ .



**Figure 6: Myeloid progenitor quantification in hematopoietic organs**

Nucleated cells from flushed bone marrow (both lesioned and contralateral femurs; panel A), heparinised blood (panel B) or spleen homogenates (panel C) obtained from our 4 experimental groups were cultured to perform colony-forming unit assays. The numbers of

myeloid progenitors indicated in the graphs is the result of the addition of CFU-G + CFU-M and CFU-GM numbers. Statistical comparisons were carried out using paired 2-way ANOVA (contralateral and lesioned femur bone marrow) or 2-way ANOVA (spleen and blood) tests followed by Newman-Keuls post-hoc tests. \*  $p < 0.05$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ .



**Figure 7: Secretome analysis in lesioned femur bone marrow**

Bone marrow supernatants containing growth factors secreted by bone marrow cells were subjected to array-based multiplex sandwich Elisa analysis (Agilent G2505B microarray scanning device and Q-analyzer software analysis) to quantify levels of secreted Dkk-1 (panel A), MIP-1 $\alpha$  (panel B), HGF (panel C) and VEGF (panel D). Two-way ANOVA tests were made to compare the influence of hypoxia and tail suspension on these cytokine levels. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ .



## References

- Bielby, R., E. Jones and D. McGonagle (2007). "The role of mesenchymal stem cells in maintenance and repair of bone." *Injury* **38 Suppl 1**: S26-32.
- Eliasson, P. and J. I. Jonsson (2010). "The hematopoietic stem cell niche: low in oxygen but a nice place to be." *J Cell Physiol* **222**(1): 17-22.
- Eliasson, P., M. Rehn, P. Hammar, P. Larsson, O. Sirenko, L. A. Flippin, J. Cammenga and J. I. Jonsson (2010). "Hypoxia mediates low cell-cycle activity and increases the proportion of long-term-reconstituting hematopoietic stem cells during in vitro culture." *Exp Hematol* **38**(4): 301-310 e302.
- Fehrer, C., R. Brunauer, G. Laschober, H. Unterluggauer, S. Reitingner, F. Kloss, C. Gully, R. Gassner and G. Lepperdinger (2007). "Reduced oxygen tension attenuates differentiation capacity of human mesenchymal stem cells and prolongs their lifespan." *Aging Cell* **6**(6): 745-757.
- Garcia, P., A. Pieruschka, M. Klein, A. Tami, T. Histing, J. H. Holstein, C. Scheuer, T. Pohlemann and M. D. Menger (2012). "Temporal and spatial vascularization patterns of unions and nonunions: role of vascular endothelial growth factor and bone morphogenetic proteins." *J Bone Joint Surg Am* **94**(1): 49-58.
- Granero-Molto, F., J. A. Weis, M. I. Miga, B. Landis, T. J. Myers, L. O'Rear, L. Longobardi, E. D. Jansen, D. P. Mortlock and A. Spagnoli (2009). "Regenerative effects of transplanted mesenchymal stem cells in fracture healing." *Stem Cells* **27**(8): 1887-1898.
- Guitart, A. V., C. Debeissat, F. Hermitte, A. Villacreces, Z. Ivanovic, H. Boeuf and V. Praloran (2011). "Very low oxygen concentration (0.1%) reveals two FDCP-Mix cell subpopulations that differ by their cell cycling, differentiation and p27KIP1 expression." *Cell Death Differ* **18**(1): 174-182.
- He, Y. X., G. Zhang, X. H. Pan, Z. Liu, L. Z. Zheng, C. W. Chan, K. M. Lee, Y. P. Cao, G. Li, L. Wei, L. K. Hung, K. S. Leung and L. Qin (2011). "Impaired bone healing pattern in mice with ovariectomy-induced osteoporosis: A drill-hole defect model." *Bone* **48**(6): 1388-1400.
- Imai, Y., H. Terai, C. Nomura-Furuwatari, S. Mizuno, K. Matsumoto, T. Nakamura and K. Takaoka (2005). "Hepatocyte growth factor contributes to fracture repair by upregulating the expression of BMP receptors." *J Bone Miner Res* **20**(10): 1723-1730.
- Kitaori, T., H. Ito, E. M. Schwarz, R. Tsutsumi, H. Yoshitomi, S. Oishi, M. Nakano, N. Fujii, T. Nagasawa and T. Nakamura (2009). "Stromal cell-derived factor 1/CXCR4 signaling is critical for the recruitment of mesenchymal stem cells to the fracture site during skeletal repair in a mouse model." *Arthritis Rheum* **60**(3): 813-823.
- Kubota, Y., K. Takubo and T. Suda (2008). "Bone marrow long label-retaining cells reside in the sinusoidal hypoxic niche." *Biochem Biophys Res Commun* **366**(2): 335-339.
- Kular, J., J. Tickner, S. M. Chim and J. Xu (2012). "An overview of the regulation of bone remodelling at the cellular level." *Clinical Biochemistry* **45**: 863-873.
- Kumagai, K., A. Vasanji, J. A. Drazba, R. S. Butler and G. F. Muschler (2008). "Circulating cells with osteogenic potential are physiologically mobilized into the fracture healing site in the parabiotic mice model." *J Orthop Res* **26**(2): 165-175.
- Li, P., J. Huang, H. J. Tian, Q. Y. Huang, C. H. Jiang and Y. Q. Gao (2011). "Regulation of bone marrow hematopoietic stem cell is involved in high-altitude erythrocytosis." *Exp Hematol* **39**(1): 37-46.

- Liu, L., Q. Yu, J. Lin, X. Lai, W. Cao, K. Du, Y. Wang, K. Wu, Y. Hu, L. Zhang, H. Xiao, Y. Duan and H. Huang (2011). "Hypoxia-inducible Factor-1alpha is essential for Hypoxia-induced MSC mobilization into the peripheral blood." Stem Cells and development **20**(11): 1961-1971.
- Lu, C., N. Saless, X. Wang, A. Sinha, S. Decker, G. Kazakia, H. Hou, B. Williams, H. M. Swartz, T. K. Hunt, T. Miclau and R. S. Marcucio (2013). "The role of oxygen during fracture healing." Bone **52**(1): 220-229.
- Machwate, M., E. Zerath, X. Holy, P. Pastoureau and P. J. Marie (1994). "Insulin-like growth factor-I increases trabecular bone formation and osteoblastic cell proliferation in unloaded rats." Endocrinology **134**(3): 1031-1038.
- Maes, C., G. Carmeliet and E. Schipani (2012). "Hypoxia-driven pathways in bone development, regeneration and disease." Nat Rev Rheumatol **8**(6): 358-366.
- Makley, J. T., K. G. Heiple, S. W. Chase and C. H. Herndon (1967). "The effect of reduced barometric pressure on fracture healing in rats." J Bone Joint Surg Am **49**(5): 903-914.
- Matsumoto, T., K. Atsuhiko, KurodaRyosuke, IshikawaMasakazu, MifuneYutaka, IwasakiHiroto, MiwaMasahiko, HoriiMiki, HayashiSaeko, OyamadaAkira, N. Hiromi, MurasawaSatoshi, DoitaMinoru, KurosakaMasahiro and AsaharaTakayuki (2006). "Therapeutic Potential of Vasculogenesis and Osteogenesis Promoted by Peripheral Blood CD34-Positive Cells for Functional Bone Healing." The American Journal of Pathology **169**(4): 1440-1457.
- Matsumoto, T., D. Goto and S. Sato (2013). "Subtraction micro-computed tomography of angiogenesis and osteogenesis during bone repair using synchrotron radiation with a novel contrast agent." Lab Invest **93**(9): 1054-1063.
- Miharada, K., G. Karlsson, M. Rehn, E. Rorby, K. Siva, J. Cammenga and S. Karlsson (2011). "Cripto regulates hematopoietic stem cells as a hypoxic-niche-related factor through cell surface receptor GRP78." Cell Stem Cell **9**(4): 330-344.
- Morvan, F., K. Boulukos, P. Clement-Lacroix, S. Roman Roman, I. Suc-Royer, B. Vayssiere, P. Ammann, P. Martin, S. Pinho, P. Pognonec, P. Mollat, C. Niehrs, R. Baron and G. Rawadi (2006). "Deletion of a single allele of the Dkk1 gene leads to an increase in bone formation and bone mass." J Bone Miner Res **21**(6): 934-945.
- Parmar, K., P. Mauch, J. A. Vergilio, R. Sackstein and J. D. Down (2007). "Distribution of hematopoietic stem cells in the bone marrow according to regional hypoxia." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(13): 5431-5436.
- Pignolo, R. J. and M. Kassem (2011). "Circulating osteogenic cells: implications for injury, repair, and regeneration." J Bone Miner Res **26**(8): 1685-1693.
- Raheja, L. F., D. C. Genetos, A. Wong and C. E. Yellowley (2011). "Hypoxic regulation of mesenchymal stem cell migration: the role of RhoA and HIF-1alpha." Cell Biol Int **35**(10): 981-989.
- Rao, R. R. and J. P. Stegemann (2013). "Cell-based approaches to the engineering of vascularized bone tissue." Cytotherapy **15**(11): 1309-1322.
- Rehn, M., A. Olsson, K. Reckzeh, E. Diffner, P. Carmeliet, G. Landberg and J. Cammenga (2011). "Hypoxic induction of vascular endothelial growth factor regulates murine hematopoietic stem cell function in the low-oxygenic niche." Blood **118**(6): 1534-1543.
- Rocheftort, G. Y., B. Delorme, A. Lopez, O. Herault, P. Bonnet, P. Charbord, V. Eder and J. Domenech (2006). "Multipotential mesenchymal stem cells are mobilized into peripheral blood by hypoxia." Stem Cells **24**(10): 2202-2208.

- Rosova, I., M. Dao, B. Capoccia, D. Link and J. A. Nolte (2008). "Hypoxic preconditioning results in increased motility and improved therapeutic potential of human mesenchymal stem cells." *Stem Cells* **26**(8): 2173-2182.
- Sakata, T., A. Sakai, H. Tsurukami, N. Okimoto, Y. Okazaki, S. Ikeda, T. Norimura and T. Nakamura (1999). "Trabecular bone turnover and bone marrow cell development in tail-suspended mice." *J Bone Miner Res* **14**(9): 1596-1604.
- Shahnazari, M., P. Kurimoto, B. M. Boudignon, B. E. Orwoll, D. D. Bikle and B. P. Halloran (2012). "Simulated spaceflight produces a rapid and sustained loss of osteoprogenitors and an acute but transitory rise of osteoclast precursors in two genetic strains of mice." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **303**(11): E1354-1362.
- Suda, T., K. Takubo and G. L. Semenza (2011). "Metabolic regulation of hematopoietic stem cells in the hypoxic niche." *Cell Stem Cell* **9**(4): 298-310.
- Takubo, K., N. Goda, W. Yamada, H. Iriuchishima, E. Ikeda, Y. Kubota, H. Shima, R. S. Johnson, A. Hirao, M. Suematsu and T. Suda (2010). "Regulation of the HIF-1alpha level is essential for hematopoietic stem cells." *Cell Stem Cell* **7**(3): 391-402.
- Tsubaki, M., C. Kato, M. Manno, M. Ogaki, T. Satou, T. Itoh, T. Kusunoki, Y. Tanimori, K. Fujiwara, H. Matsuoka and S. Nishida (2007). "Macrophage inflammatory protein-1alpha (MIP-1alpha) enhances a receptor activator of nuclear factor kappaB ligand (RANKL) expression in mouse bone marrow stromal cells and osteoblasts through MAPK and PI3K/Akt pathways." *Mol Cell Biochem* **304**(1-2): 53-60.
- Uchida, S., A. Sakai, H. Kudo, H. Otomo, M. Watanuki, M. Tanaka, M. Nagashima and T. Nakamura (2003). "Vascular endothelial growth factor is expressed along with its receptors during the healing process of bone and bone marrow after drill-hole injury in rats." *Bone* **32**(5): 491-501.
- Uusitalo, H., J. Rantakokko, M. Ahonen, T. Jamsa, J. Tuukkanen, V. KaHari, E. Vuorio and H. T. Aro (2001). "A metaphyseal defect model of the femur for studies of murine bone healing." *Bone* **28**(4): 423-429.
- van de Kamp, J., W. Jahnen-Dechent, B. Rath, R. Knuechel and S. Neuss (2013). "Hepatocyte growth factor-loaded biomaterials for mesenchymal stem cell recruitment." *Stem Cells Int* **2013**: 892065.
- Visigalli, D., A. Strangio, D. Palmieri and P. Manduca (2010). "Hind limb unloading of mice modulates gene expression at the protein and mRNA level in mesenchymal bone cells." *BMC Musculoskelet Disord* **11**: 147.
- Wagegg, M., T. Gaber, F. L. Lohanatha, M. Hahne, C. Strehl, M. Fangradt, C. L. Tran, K. Schonbeck, P. Hoff, A. Ode, C. Perka, G. N. Duda and F. Buttgerit (2012). "Hypoxia promotes osteogenesis but suppresses adipogenesis of human mesenchymal stromal cells in a hypoxia-inducible factor-1 dependent manner." *PLoS One* **7**(9): e46483.
- Xie, Y., T. Yin, W. Wiegnaebe, X. C. He, D. Miller, D. Stark, K. Perko, R. Alexander, J. Schwartz, J. C. Grindley, J. Park, J. S. Haug, J. P. Wunderlich, H. Li, S. Zhang, T. Johnson, R. A. Feldman and L. Li (2009). "Detection of functional haematopoietic stem cell niche using real-time imaging." *Nature* **457**(7225): 97-101.
- Xu, N., H. Liu, F. Qu, J. Fan, K. Mao, Y. Yin, J. Liu, Z. Geng and Y. Wang (2013). "Hypoxia inhibits the differentiation of mesenchymal stem cells into osteoblasts by activation of Notch signaling." *Exp Mol Pathol* **94**(1): 33-39.

## **V. Discussion et perspectives**

La prise en charge des fractures osseuses avec perte de substance importante constitue un challenge pour les chirurgiens orthopédiques civils et militaires. Différentes pistes de recherche sont envisagées pour améliorer cette prise en charge. Parmi elles, l'objectif de mon travail de thèse a été d'étudier *in vivo* si et comment le recrutement de cellules ostéoprogénitrices, d'origine mésenchymateuse (pour les ostéoblastes) ou hématopoïétique (pour les ostéoclastes) dans l'os lésé améliore sa réparation. Pour ceci, nous avons étudié si l'hypoxie hypobare qui est un facteur mobilisateur, favorisait *in vivo* leur mobilisation chez des souris porteuses ou non d'un défaut osseux. Nous avons également cherché à moduler le nombre d'ostéoprogéniteurs disponibles au niveau médullaire avant le déclenchement de l'épisode hypoxique, en appliquant aux souris une période de pré-conditionnement, soit de suspension hypodynamique, soit d'exercice physique volontaire. Nos résultats montrent, chez des souris non porteuses d'un défaut osseux, un effet mobilisateur de l'hypoxie sur les CSH/PH, associé à un découplage osseux qui se manifeste ici par l'augmentation des ostéoclastes et la diminution des ostéoblastes. La suspension, qui génère également un découplage osseux, tend à limiter la mobilisation des progéniteurs hématopoïétiques induite par l'hypoxie.

Chez des souris porteuses d'un défaut osseux, une amélioration de la réparation par l'hypoxie est constatée, sans influence de la suspension sur cette amélioration. Une mobilisation des progéniteurs mésenchymateux et hématopoïétiques est mise en évidence, mais le mode d'action de l'hypoxie passerait plutôt par une accélération des mécanismes de réparation dans la zone lésée.

***De l'utilisation des modèles d'hypoxie hypobare et de l'hypodynamie à l'étude de la réparation osseuse : genèse de l'étude et discussion des modèles.***

Plusieurs questions ont émergé au commencement de ce travail :

***Quels types de cellules mobiliser ?***

Comme illustré par les rappels bibliographiques de ce manuscrit, la physiologie du tissu osseux est à la fois complexe et dynamique. Cette complexité et ce dynamisme sont rendus possibles par des dialogues entre les deux principaux types cellulaires du tissu, les ostéoblastes et les ostéoclastes. C'est l'émergence du concept de niche médullaire à la fin des années 70 qui a fait apparaître la notion de dialogue entre la lignée stromale et la lignée hématopoïétique. Dès lors, la connaissance de ce dialogue n'a cessé de progresser et avec elle, la compréhension de l'importance de ce dialogue dans la régulation des mécanismes physiologiques du tissu osseux. L'un des principaux fers de lance de ce dialogue est la triade moléculaire RANK / RANKL / ostéoprotégérine découverte en 1997 (Simonet, Lacey et al. 1997) qui a notamment permis d'expliquer la dualité du mode d'action de la PTH. L'hormone PTH est capable d'exercer un pouvoir ostéo-résorbant et ostéo-formateur en fonction de son mode d'administration, respectivement continu ou intermittent. Or, son récepteur n'est présent que sur la membrane des ostéoblastes, et est absent de celle des ostéoclastes. Ce paradoxe a pris fin avec la découverte du mécanisme de contrôle de la différenciation ostéoclastique par les ostéoblastes *via* le système RANKL. La PTH administrée de façon continue augmente la résorption osseuse en inhibant la sécrétion d'OPG et en activant celle de RANKL par les ostéoblastes (Fu, Jilka et al. 2002). A l'inverse, lors d'une administration intermittente, l'hormone favorise la formation osseuse en renforçant directement l'activité ostéoblastique et en diminuant l'expression de RANKL par les ostéoblastes de façon à inhiber l'ostéoclastogénèse.

Si l'importance du dialogue entre lignées mésenchymateuse et hématopoïétique dans le cadre du métabolisme osseux physiologique est maintenant incontestée, il n'en est pas de même pour la réparation osseuse. Ainsi, en date du 2 octobre 2013, la recherche des termes « bone healing and mesenchymal stem cells » dans Pubmed révèle 1072 entrées ; celle des termes « bone healing and hematopoietic stem cells » n'en compte que 211, soit 5 fois moins. Cela est révélateur du trop peu d'importance qui est accordé à la lignée hématopoïétique dans le cadre de la réparation osseuse, mais aussi de la dichotomie qui est réalisée entre les deux lignées hématopoïétique et mésenchymateuse dans la majorité des études actuelles portant sur ce mécanisme réparateur.

Notre volonté, au commencement de ce projet de thèse, était de ne pas dissocier les deux composantes mésenchymateuse et hématopoïétique, et de les intégrer conjointement à notre stratégie d'amélioration de la réparation osseuse par mobilisation cellulaire.

### ***Comment provoquer la mobilisation ?***

Dans le contexte défini ci-dessus, il était nécessaire, au commencement du projet, de choisir un facteur de mobilisation potentiellement capable d'induire la mobilisation des progéniteurs mésenchymateux **et** hématopoïétiques. Nous avons d'abord pensé à un traitement pharmacologique. Il est bien établi que le G-CSF mobilise les CSH/PH dans la circulation sanguine. Il est d'ailleurs actuellement utilisé en clinique humaine, parfois utilisé avec l'AMD3100, pour mobiliser les CSH/PH chez les donneurs sains ou chez des patients « mauvais mobilisateurs » atteints de lymphomes non hodgkiniens ou de myélomes (Jansen, Hanks et al. 2005) (Pitchford, Furze et al. 2009). En revanche, au commencement de notre étude, les effets du G-CSF sur la mobilisation des progéniteurs mésenchymateux étaient moins clairs. L'absence de progéniteurs mésenchymateux dans le sang de patients traités au G-CSF avait été démontrée en 1997 dans l'étude de Lazarus (Lazarus, Haynesworth et al. 1997), comme dans celle d'Ojeda-Urbe (Ojeda-Urbe, Brunot et al. 1993). En parallèle, une autre étude avait mis en évidence l'absence du récepteur au G-CSF sur la membrane des progéniteurs mésenchymateux (Avalos 1996). L'ensemble de ces données nous avait incités à utiliser un autre facteur de mobilisation dans notre étude. Toutefois, il est intéressant de noter que, depuis, la mobilisation des CSM par le G-CSF a été prouvée (Deng, Zou et al. 2011).

Notre Institut est depuis de nombreuses années concerné par l'adaptation de l'homme à l'hypoxie hypobare, un environnement dans lequel la diminution de pression de l'air atmosphérique conduit à la diminution de la pression partielle de chacun des gaz qui le composent, dont le dioxygène (Savoirey, Jean-Claude et al. 2003). Il était connu que la lignée hématopoïétique était fortement sollicitée dans les conditions d'hypoxie hypobare (Huff, Kaufman et al. 1975). De manière plus précise, déjà en 1973, le pouvoir mobilisateur de l'hypoxie sur la lignée hématopoïétique est étudié par Lord et Murphy qui placent des souris en caisson hypobare à 22 000 pieds (6700 mètres) pendant une durée de un à quinze jours. A l'aide de tests clonogéniques, les auteurs constatent que la distribution des CSH/PH fluctue dans la moelle et la rate des animaux sous hypoxie (Lord and Murphy 1973). Plus

récemment, la mobilisation de ces progéniteurs par l'hypoxie hypobare en caisson (altitude simulée de 6000 mètres) a été montrée par l'équipe de Li. Dans cette étude, les auteurs notent aussi de façon intéressante que l'hypoxie augmente, au niveau médullaire, l'engagement des progéniteurs hématopoïétiques KSL vers la lignée érythrocytaire, aux dépens de la lignée granulo-monocytaire (Li, Huang et al. 2011). Concernant les progéniteurs mésenchymateux, leur mobilisation par l'hypoxie hypobare a été démontrée chez le rat par l'équipe de Rochefort en 2006 (Rochefort, Bruno et al. 2006). En plaçant pendant trois semaines des rats en caisson à 50 kpa, une augmentation du pool des CFU-F dans le sang des animaux est constatée. En revanche, de façon surprenante, les auteurs ne mettent pas en évidence de mobilisation sanguine des progéniteurs hématopoïétiques dans cette étude. L'ensemble des données suggère que la distribution tissulaire des CSH/PH oscille pendant la durée de l'hypoxie. L'IRBA disposant de caissons hypobariques, il nous a paru judicieux d'étudier l'intérêt d'une mobilisation des progéniteurs hématopoïétiques et/ou mésenchymateux par le biais de l'hypoxie respiratoire dans le cadre de la réparation osseuse. Dans un premier temps, une cinétique de 2, 4 et 9 jours de caisson a été réalisée de façon à déterminer la durée d'hypoxie induisant une mobilisation optimale des progéniteurs hématopoïétiques dans notre modèle animal. La plus grande amplitude de mobilisation des progéniteurs dans le sang ayant été observée dès 4 jours de caisson (résultats non communiqués ici), nous avons sélectionné cette durée pour l'ensemble de notre étude.

### ***Moduler la taille du pool des ostéoprogéniteurs influence-t-il la mobilisation des CSH/PH et des CSM ?***

La taille des pools médullaires des progéniteurs hématopoïétiques et mésenchymateux pourrait conditionner leur disponibilité à la mobilisation. Dès lors, il nous semblait intéressant d'intégrer ce paramètre à notre étude de mobilisation sous hypoxie.

L'exercice physique favorise l'ostéoblastogenèse (Ozcivici, Luu et al. 2010) alors qu'à l'inverse, la perte des contraintes mécaniques liée à l'immobilisation la diminue (Machwate, Zerath et al. 1994) (Vandamme, Holy et al. 2012). Compte tenu des interactions cellulaires entre progéniteurs hématopoïétiques et ostéoblastes au sein des niches médullaires (cf chapitre II.B.3) et des corrélations entre le nombre d'ostéoblastes et celui des CSH/PH dans la moelle (Calvi, Adams et al. 2003) (Zhang, Niu et al. 2003), il était postulé que le potentiel ostéoblastique (nombre et activité) pouvait influencer la mobilisation des progéniteurs

hématopoïétiques. Notre hypothèse était alors que la modulation des ostéoprogéniteurs par l'exercice physique ou l'immobilisation pouvait avoir des conséquences sur la mobilisation des progéniteurs hématopoïétiques et mésenchymateux induite par l'hypoxie respiratoire. Pour tester cette hypothèse, nous avons pris le parti d'appliquer aux souris une période de conditionnement - soit de suspension hypodynamique, soit d'exercice physique volontaire - de façon à moduler le nombre d'ostéoblastes **avant** le déclenchement de l'épisode hypoxique. Dans un premier temps, l'hypothèse a été testée dans un contexte dénué des mécanismes de réparation, puis dans le cadre de la réparation osseuse.

Concernant l'exercice volontaire, l'accès à une roue d'exercice de type écureuil était rendu libre aux souris pendant trois semaines. Chez le rat, une durée de trois semaines est suffisante pour induire un gain d'ostéoblastes dans la métaphyse secondaire (Holy and Zerath 2000). Nos enregistrements électroniques indiquent que la distance moyenne parcourue par souris par 24 heures s'élève à 4973 +/- 273 mètres. Malgré cela, nous n'avons pas pu mettre en évidence de gain ostéoblastique chez les souris coureuses. Chez cette espèce, une durée de trois semaines d'exercice volontaire semble trop brève pour générer un gain ostéoblastique. Les études préliminaires sur ce sujet ne sont pas intégrées dans ce travail, mais celles-ci seront prochainement relancées.



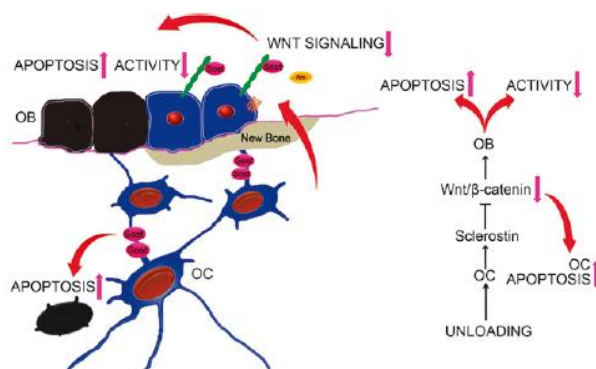
## 2) Chez les animaux non opérés, quels mécanismes peuvent être à l'origine des découplages osseux observés dans les modèles de suspension et d'hypoxie ?

Chez les animaux non opérés des lots SN (effet de la suspension) et TH (effet de l'hypoxie), nous mettons en évidence dans les deux modèles un découplage osseux, qui se manifeste ici par l'augmentation des ostéoclastes et la diminution des ostéoblastes. Mais nos résultats suggèrent que les mécanismes physiologiques à l'origine de ces découplages pourraient être différents.

### Le modèle murin d'hypodynamie par

**suspension** est bien décrit dans la littérature. Les connaissances actuelles indiquent que le découplage est induit par la perte des contraintes mécaniques sur les membres postérieurs de l'animal, altérant la mécano-transduction. De nombreuses études suggeraient le rôle pivot joué par les ostéocytes dans ce mécanisme depuis plusieurs années, en particulier une élégante étude de Tatsumi en 2007. Cette équipe a développé un modèle de souris transgénique dans

lequel les ostéocytes expriment spécifiquement le récepteur de la toxine botulique. L'injection de la toxine conduit alors à la suppression de près de 70 à 80 % des ostéocytes. Les résultats indiquent que ceci rend les souris résistantes à la perte osseuse induite par la suspension (Tatsumi, Ishii et al. 2007). D'un point de vue moléculaire, les études les plus récentes montrent que la perte des contraintes mécaniques induit une augmentation de la synthèse de la sclérostine par les ostéocytes, un antagoniste de la voie de signalisation pro-ostéoblastique Wnt (Spatz, Ellman et al. 2013). La sécrétion de sclérostine aboutit à l'apoptose des ostéoblastes et des ostéocytes. En parallèle, les ostéocytes exercent une



### V-1 : Fonction de la sclérostine et signalisation Wnt en réponse à la perte des contraintes mécaniques.

Les ostéocytes augmentent leur production de sclérostine, qui va inhiber la signalisation Wnt/β-caténine. L'activité des ostéoblastes est réduite en conséquence, et l'apoptose des ostéocytes et des ostéoblastes est induite. Abréviations : OB : ostéoblastes ; OC : ostéocytes.

Source : (O'Brien, Nakashima et al. 2012).

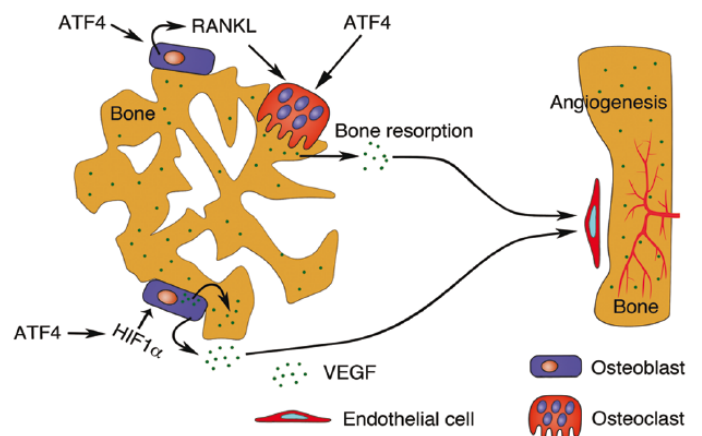
action directe sur l'ostéoclastogénèse, qu'ils stimulent par le biais de RANK-L (O'Brien, Nakashima et al. 2012).

Nos résultats sont en accord avec la littérature, dans la mesure où, à notre connaissance, aucune étude ne fait état d'une hausse de la mobilisation des CSH/PH et CSM chez les animaux placés en suspension. Dans notre modèle, la suspension en condition normoxique ne se traduit que par un découplage au niveau osseux.

Le découplage osseux mis en évidence dans les **lots hypoxiques** pourrait être attribué au concept émergent faisant état de l'existence d'une relation entre l'angiogenèse et l'ostéogénèse. Un modèle très récent de ce couplage a été proposé par Zhu et al, basé sur le facteur de transcription ATF4 (Activating Transcription Factor 4) (Zhu, Jiao et al. 2013). Dans ce modèle schématisé ci-contre, ATF4 interagirait avec HIF-1 $\alpha$ , permettant la stabilisation de ce dernier et l'augmentation de son expression dans les ostéoblastes hypoxiques.

L'augmentation de la signalisation HIF dans les ostéoblastes conduirait à une augmentation de l'expression du VEGF. Le VEGF se lierait alors directement à son récepteur localisé sur la membrane des cellules endothéliales pour favoriser l'angiogenèse, ou bien serait stocké dans la matrice osseuse. Parallèlement, ATF4 agirait directement sur les ostéoclastes pour favoriser leur différenciation et leur activité (Cao, Yu et al. 2010). Sous l'effet des ostéoclastes, la résorption permettrait alors une augmentation secondaire du facteur VEGF

consécutives à sa libération de la matrice, menant à une élévation de l'angiogenèse osseuse. L'augmentation des ostéoclastes observée chez nos animaux TH dans nos conditions expérimentales est en accord avec ce modèle. Cependant, il ne fournirait qu'une explication partielle à nos résultats car un effet stimulateur de l'ostéoblastogénèse par voie autocrine a été attribué *in vitro* à ATF4 (Yang, Matsuda et al. 2004). Ce dernier point est en désaccord avec nos propres résultats puisqu'une diminution de la surface occupée par les ostéoblastes est observée chez nos souris hypoxiques. Toutefois, si les résultats sur l'ostéoclastogénèse



**V-2 : Modèle du couplage entre l'angiogenèse et l'ostéogénèse par ATF4.**

Source : (Zhu, Jiao et al. 2013).

sont assez clairs dans la littérature, les effets de l'hypoxie sur la différenciation des ostéoblastes diffèrent davantage.

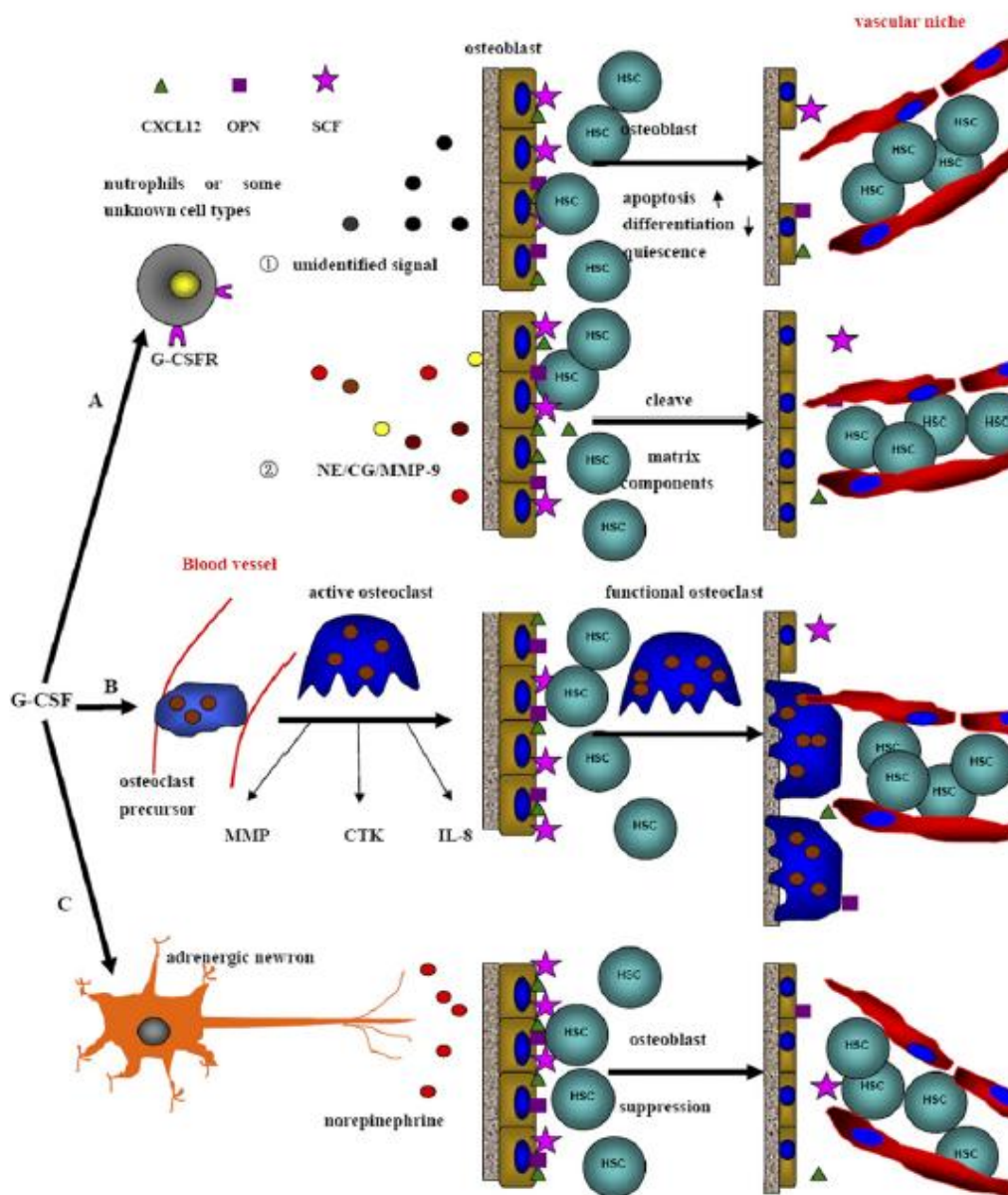
L'année dernière, Chen et al ont mis en évidence une action synergique de HIF-1 $\alpha$  et du facteur de transcription Osx sur l'inhibition de la voie Wnt menant à une diminution de l'ostéoblastogenèse (Chen, Li et al. 2012). Les auteurs de cette étude ont complété leurs données cette année, en 2013, en montrant que l'inhibition de la voie Wnt dans les ostéoblastes par l'hypoxie pourrait passer par une action autocrine de la sclérostine, dont l'expression est activée par HIF-1 $\alpha$  (Chen, Li et al. 2013).

La diminution des ostéoblastes que nous observons pourrait donc être liée à une modulation de la voie Wnt par l'hypoxie. De la même façon que Dkk-1, un inhibiteur de la voie Wnt, et VEGF ont été dosés chez les animaux opérés, il serait intéressant de quantifier ces protéines dans le surnageant médullaire des animaux non porteurs d'un défaut osseux.

Une autre voie, basée davantage sur l'adaptation physiologique mise en œuvre par les souris pour assurer leur survie en ces conditions de stress hématopoïétique, pourrait être envisagée. Elle prend en compte la mobilisation des CSH/PH mise en évidence chez nos animaux hypoxiques.

En effet, des résultats obtenus à partir de modèles de mobilisation induite par le G-CSF montrent une augmentation de l'ostéoclastogenèse et une diminution de l'ostéoblastogenèse (Kollet, Dar et al. 2006) (Katayama, Battista et al. 2006) (Li, Zhai et al. 2011). Nos propres résultats sont en accord avec ces données. Dans le cadre des études avec le G-CSF, il est suggéré que c'est la mobilisation des CSH/PH générée par le stress hématopoïétique qui induirait le découplage osseux. Les rôles des ostéoblastes et des ostéoclastes dans la mobilisation des CSH/PH induite par le G-CSF, actuellement toujours matière à débat, sont récapitulés par Li et al dans la figure V-3. Dans ce schéma, trois modes d'action du G-CSF sont suggérés (A, B, C). L'absence du récepteur au G-CSF sur la membrane des ostéoblastes suggère une action indirecte du facteur de stimulation sur la population ostéoblastique, par le biais d'une sous-population de neutrophiles exprimant le récepteur G-CSFR (A). Ces derniers réguleraient alors négativement le nombre et l'activité des ostéoblastes (A1 sur la figure) (Singh, Hu et al. 2012) et induiraient également la libération de protéases permettant le clivage de l'axe SDF-1/CXCR4 (A2 sur la figure) (Petit, Szyper-Kravitz et al. 2002). Répondant directement au G-CSF, les progéniteurs granulo-

monocytaires de la moelle osseuse prolifèraient et augmenteraient leur différenciation en ostéoclastes matures (B sur la figure). Ils occuperaient la surface osseuse laissée libre par la rétractation des ostéoblastes et libèraient des protéases, telles que la MMP-9, participant à la mobilisation des CSH/PH (Kollet, Dar et al. 2006). Une troisième voie passerait par le système nerveux sympathique (SNS, C sur la figure), activé par le G-CSF, et qui agirait directement sur les ostéoblastes. L'action directe du SNS serait liée à la libération de catécholamine (norépinephrine) qui stimulerait les récepteurs  $\beta 2$  adrénergiques situés sur la membrane des ostéoblastes diminuant leur activité (Katayama, Battista et al. 2006).



**V-3 : découplage osseux et mobilisation des CSH/PH**  
 Source : (Li, Zhai et al. 2011).

Le stress hématopoïétique généré par le G-CSF est un stress de nature granulo-monocytaire, contrairement au stress hypoxique, qui est davantage de nature érythrocytaire. Même si cela incite à rester prudent au sujet d'une analogie du mode d'action entre l'hypoxie et le G-CSF, certains mécanismes moléculaires pourraient être partagés. Ainsi, par exemple, l'hypoxie respiratoire augmente l'activité du système nerveux sympathique (Hainsworth, Drinkhill et al. 2007), ce qui entre bien dans le cadre d'une diminution des ostéoblastes chez les animaux placés en caisson hypobare. Il serait particulièrement intéressant de doser le G-CSF systémique chez nos souris pour savoir si l'épisode hypoxique augmente la concentration de ce facteur de croissance dans nos conditions expérimentales.

Des données très récentes de la littérature viennent compléter ce modèle de mobilisation / découplage osseux par le G-CSF et étayer nos données expérimentales. L'équipe d'Asada vient d'attribuer un rôle fondamental aux ostéocytes dans l'initiation de la mobilisation des CSH/PH (Asada, Katayama et al. 2013). Les auteurs montrent en effet que l'injection de G-CSF induit des changements d'ordre moléculaire et morphologique du réseau ostéocytaire qui précèdent la rétractation des ostéoblastes. Cette réponse rapide des ostéocytes au G-CSF semble être sous le contrôle du système nerveux sympathique dans la mesure où il est montré que les ostéocytes expriment le récepteur  $\beta_2$  adrénergique et qu'une sympathectomie chirurgicale supprime la réponse ostéocytaire. En s'appuyant sur un modèle de souris transgénique, les auteurs montrent également que l'ablation spécifique des ostéocytes altère fortement la mobilisation des CSH/PH de la moelle vers le sang en réponse au G-CSF. Nos propres résultats montrant que la suspension module la mobilisation des progéniteurs érythrocytaires en réponse à l'hypoxie sont en adéquation avec ces observations. En effet, l'apoptose des ostéocytes en réponse à l'hypodynamie est un mécanisme rapide, qui intervient chez la souris dès le troisième jour de suspension (Aguirre, 2006). Dans notre modèle, chez les animaux SH, la perte des ostéocytes débute donc avant le commencement de l'épisode hypoxique mobilisateur et pourrait être à l'origine de la diminution du potentiel de mobilisation des CSH/PH et des CSM rencontrée dans les fémurs hypodynamiques.

L'équipe d'Asada s'est également intéressée à la chimiokine SDF-1, molécule qui favoriserait la rétention des CSH/PH dans la niche, et qui est considérée comme le candidat majeur de la mobilisation des progéniteurs hématopoïétiques (Aiuti, Webb et al. 1997). Les auteurs

montrent que la diminution de SDF-1 dans la moelle osseuse des animaux transgéniques en réponse au G-CSF présente la même amplitude que celle observée chez les animaux témoins non transgéniques. Pourtant, la mobilisation est altérée chez les souris transgéniques. De façon intéressante, nos résultats vont également dans ce sens, puisque la concentration médullaire en SDF-1 est sensiblement du même ordre chez les animaux TH et SH. L'équipe d'Asada suggère que la diminution médullaire de SDF-1 n'est pas le seul mécanisme moléculaire impliqué dans la régulation de la mobilisation des CSH/PH médiée par les ostéocytes.

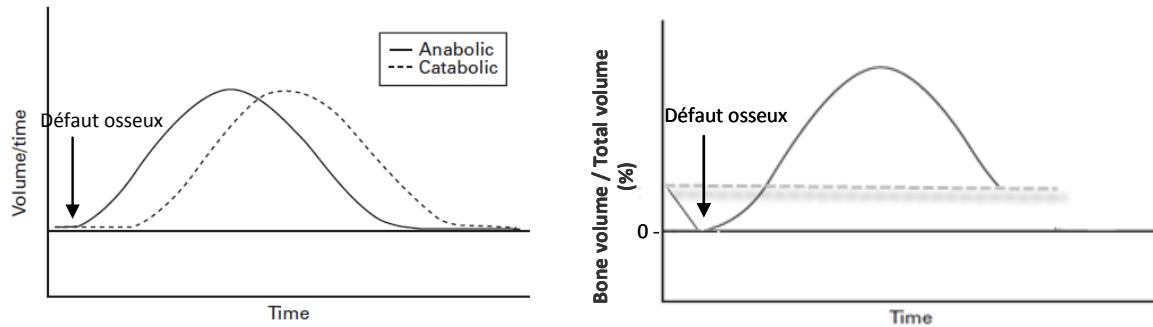
### **3) Comment l'hypoxie et la suspension exercent-elles leurs effets dans le cadre de la réparation osseuse ?**

Les mécanismes de la réparation osseuse requièrent le recrutement coordonné des ostéoprogéniteurs. En 2005, quatre zones du tissu osseux sont définies par Phillips comme sources potentielles d'ostéoprogéniteurs contribuant à la réparation : la cavité médullaire, la zone intra-corticale, le périoste et les tissus mous environnants (Phillips 2005).

Mais depuis ces dernières années, des études ont montré que les progéniteurs ostéocompétents peuvent également être recrutés à partir de tissus plus éloignés et être véhiculés jusqu'au site de réparation *via* la voie sanguine en réponse à un stimulus mobilisateur. Récemment, la présence de cellules progénitrices circulantes à potentiel ostéoblastique sur le site de fracture a été montrée dès le deuxième jour suivant la lésion osseuse (Park, Spencer et al. 2012). Concernant les progéniteurs hématopoïétiques, l'injection systémique d'une fraction de cellules CD34+ humaines, enrichie en progéniteurs hématopoïétiques, à des souris porteuses d'une fracture osseuse, améliore la réparation de la lésion (Matsumoto, Atsuhiko et al. 2006).

L'existence des ostéoprogéniteurs circulants est maintenant bien établie. Même si des élégantes études de parabiose montrent que ces cellules circulantes participent à la réparation osseuse, leur contribution exacte à ces mécanismes est toujours discutée.

D'un point de vue cinétique, la réparation osseuse peut être modélisée comme le résultat de l'orchestration de réponses cellulaires anabolique et catabolique (Little, Ramachandran et al. 2007). La réponse anabolique initiale aboutissant à une néo-formation osseuse est suivie, plus tardivement, d'une phase catabolique assurant le remodelage de l'os nouveau (figure ci-dessous).



**Figure V-4 : Succession des phases anabolique et catabolique au cours de la réparation osseuse et évolution du BV/TV.**

**A gauche** : Phases anabolique et catabolique : l'axe des ordonnées représente en unité de volume/temps les taux d'os néo-formé (ligne continue) et d'os résorbé (ligne pointillée). En abscisse se trouve le temps de réparation, avec la phase anabolique précédant la phase catabolique.

**A droite** : évolution du BV/TV au cours de la réparation. La phase ascendante du BV/TV correspondant à la néo-formation osseuse alors que la phase descendante reflète le remodelage de l'os nouveau aboutissant à un BV/TV initial.

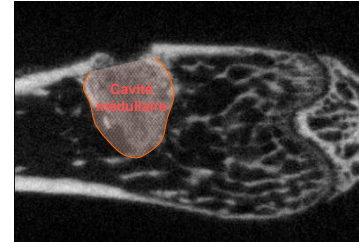
Modifié d'après Little, 2007

Cette modélisation biphasique catabolique / anabolique de la réparation est confirmée par des études histomorphométriques et moléculaires. Dans le cadre de la réparation des modèles de défauts cavitaires cortico-trabéculaires chez la souris C57Bl/6J, identiques à notre modèle chirurgical, deux études sont particulièrement intéressantes. L'étude d'Uusitalo, réalisée en 2001, montre que le volume maximal d'os néo-formé dans la zone cavitaire (BV/TV cavitaire) est atteint vers le 7<sup>e</sup> jour de réparation, et diminue à partir du 14<sup>e</sup> jour. Ces observations sont corrélées par des analyses transcriptomiques au niveau de la moelle osseuse qui révèlent un pic d'expression des marqueurs ostéoblastiques du collagène à J<sub>7</sub> post-opératoire, suivie de leur diminution rapide. Les ARN<sub>m</sub> des marqueurs ostéoclastiques (MMP-9, TRAP et cathepsine K) voient leur niveau de transcription augmenter entre le 7<sup>ème</sup> jour et le 21<sup>ème</sup> jour suivant l'opération, sans réel pic d'expression (Uusitalo, Rantakokko et al. 2001). Des données similaires sont rapportées par l'équipe de He, qui met en évidence un BV/TV cavitaire maximal 10 jours après l'opération, concordant avec un pic sérique d'expression du marqueur de formation osseuse P1NP. Le pic maximal du marqueur de résorption CTX, reflet de la phase catabolique, est quant à lui atteint entre les 10<sup>ème</sup> et 14<sup>ème</sup> jours post-opératoires (He, Zhang et al. 2011).



Dans notre protocole expérimental décrit en II.B.2, l'épisode hypoxique est déclenché au 7<sup>ème</sup> jour suivant l'opération, notre intention étant de faire bénéficier les étapes relativement tardives de la réparation du pouvoir mobilisateur de l'hypoxie, afin de prolonger la phase anabolique.

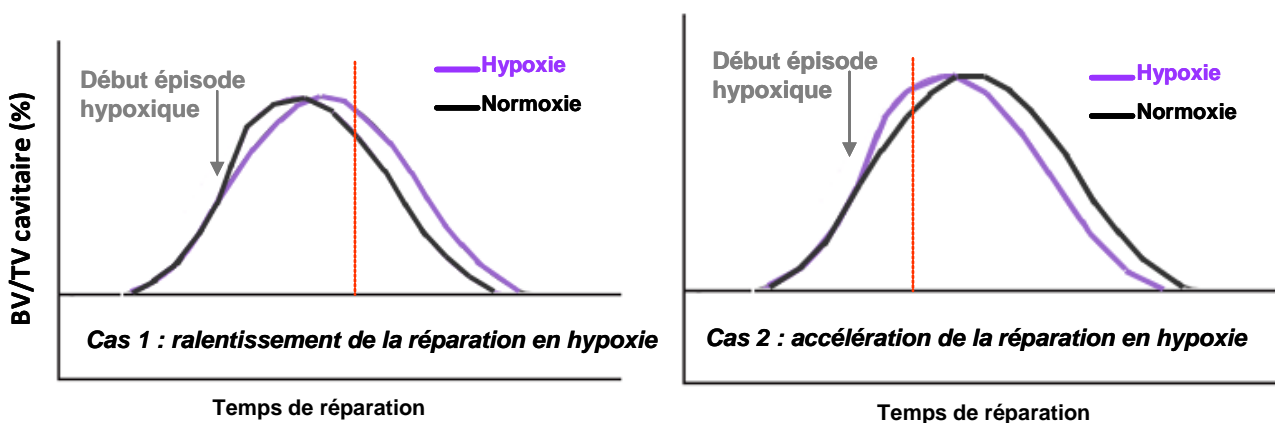
Les paramètres structuraux qui ont été obtenus ont montré une augmentation du volume osseux à l'intérieur de la cavité médullaire (BV/TV cavitaire, figure V-6) pour les animaux placés en condition hypoxique.



**Figure V-5 : Comblement de la cavité médullaire.**

Cette observation pouvait suggérer deux hypothèses

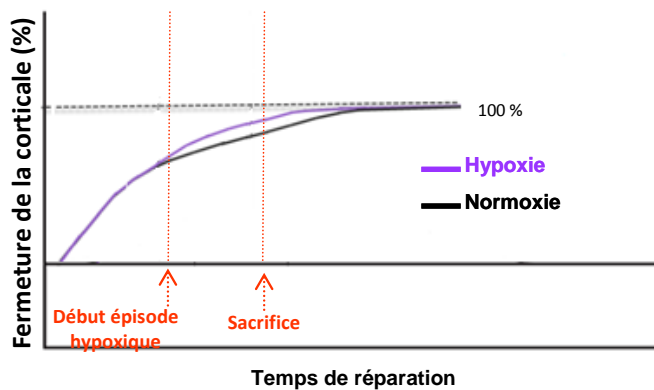
principales, modélisées sur la figure V-7 : un ralentissement ou une accélération de la réparation du défaut cavitaire.



**Figure V-6 : Evolution du BV/TV cavitaire et hypothèses de ralentissement ou d'accélération de la réparation en condition hypoxique.**

Dans les deux cas, le BV/TV cavitaire en hypoxie est supérieur à celui en normoxie. Toutefois, au sacrifice (ligne verticale rouge), l'augmentation du BV/TV hypoxique peut signifier soit un ralentissement (cas 1), soit une accélération des processus de réparation (cas 2).

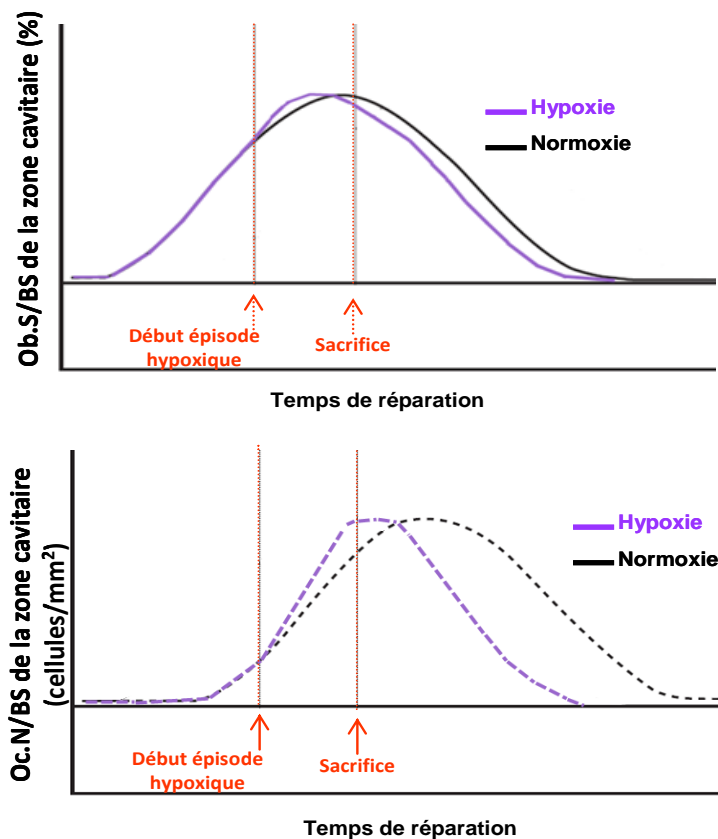
L'augmentation de la fermeture de l'os cortical observée chez les animaux placés en caisson hypobare est un argument en faveur d'une accélération de la réparation sous hypoxie, et non pas d'un ralentissement (figure V-8).



**Figure V-7 : Amélioration de la fermeture de l'os cortical en condition hypoxique.**

L'augmentation du taux de comblement de l'os cortical au niveau de la zone de défaut indique une accélération du processus de réparation. L'épisode hypoxique est déclenché 7 jours après l'opération et le sacrifice intervient à J<sub>11</sub> post-opération.

Concernant les paramètres cellulaires au niveau de la zone cavitaire, l'augmentation de l'Oc.N/BS concomitante à la diminution de l'Ob.S/BS en condition hypoxique suggère que la phase catabolique a été atteinte plus rapidement chez les animaux placés en caisson hypobare. Ces observations sont en cohérence avec l'hypothèse d'une accélération de la réparation par l'hypoxie.



**Figure V-8 : Diminution de la surface de formation osseuse (Ob.S/BS) et augmentation de la surface de résorption (Oc.N/BS) en condition hypoxique.**

Nos résultats contrastent avec les données de la bibliographie, qui tendent à montrer un retard de la réparation sous hypoxie. Ainsi, comme déjà discuté précédemment dans l'article que nous venons de soumettre pour publication, l'équipe de Lu a montré un effet défavorable de l'hypoxie respiratoire sur la réparation d'une fracture osseuse (Lu, Saless et al. 2013). Mais les différences entre l'étude de Lu et la nôtre sont multiples. Outre des variations dans le modèle de défaut osseux (réparation endochondrale vs intramembranaire) et le type d'hypoxie (normobare vs hypobare) utilisés, la différence la plus notable porte sur le moment de démarrage de l'épisode hypoxique, puisque dans l'expérience de Lu et al., les animaux sont transférés en atmosphère hypobarique le jour même de leur opération, une fois réveillés de l'anesthésie. Une étude beaucoup plus ancienne menée en 1967 sur des rats rapportait déjà des résultats similaires. Dans cette publication de Makley (Makley, Heiple et al. 1967), des rats subissent une fracture tibiale puis sont immédiatement placés en caisson hypobare à une altitude simulée de 5500 mètres pour une durée variable. Trois lots expérimentaux sont créés : i) un lot témoin resté en normoxie, ii) un lot hypoxique non acclimaté et iii) un lot hypoxique acclimaté, c'est-à-dire ayant subi une période d'adaptation progressive à la baisse de pression barométrique dans les 15 jours précédant la création de la fracture. De manière intéressante, si un retard de réparation est bien constaté pour le lot non acclimaté, les animaux acclimatés consolident en revanche aussi bien que les animaux témoins. Les effets de l'hypoxie respiratoire sur la réparation du tissu osseux sont donc complexes, et pourraient dépendre du stade de réparation au moment où elle est appliquée. Ainsi, dans les phases précoces de la réparation, l'hypoxie respiratoire a des effets délétères sur la réparation osseuse. Appliquée dans des phases plus tardives comme dans notre modèle, elle a en revanche un effet permissif sur la réparation. Il serait très intéressant de préciser cette fenêtre temporelle de permissivité en déclenchant l'épisode hypoxique à différents moments de la réparation.

Nous montrons également que la suspension n'altère pas l'accélération de la réparation induite par l'hypoxie, ainsi que l'attestent le niveau de fermeture de la corticale et la fraction osseuse dans la cavité médullaire des animaux SH. Pourtant, comme nous l'avons vu dans la première partie du travail sur des animaux non opérés, le pool des progéniteurs hématopoïétiques et mésenchymateux disponible est plus faible chez les animaux suspendus que chez les animaux témoins. De la même manière, chez les animaux opérés, la

quantité de progéniteurs est toujours retrouvée plus faible chez les animaux suspendus. Cela suggère qu'afin de satisfaire au besoin de la réparation de la lésion, la quantité de cellules nécessaire à la réparation est arrivée sur le site lésé, quel que soit le statut témoin ou suspendu des animaux. Cela est d'ailleurs attesté par l'absence de différence de la quantité d'ostéoblastes et d'ostéoclastes sur le site de lésion entre les animaux suspendus et témoins.

### **Comment s'exprime l'effet permissif de l'hypoxie respiratoire sur les phases avancées de la réparation osseuse?**

Il est difficile de savoir si l'effet bénéfique de l'hypoxie doit être imputé à un second épisode de mobilisation des CSH/PH et CSM, davantage à un effet direct sur les éléments cellulaires déjà présents sur le site de fracture, ou à ces deux mécanismes.

Un effet mobilisateur de l'hypoxie est mis en évidence pour les progéniteurs hématopoïétiques, qui circulent du fémur controlatéral vers le fémur opéré et la rate, *via* la circulation sanguine. Pour les progéniteurs mésenchymateux, une mobilisation du fémur controlatéral vers l'opéré est identifiée, mais cette mobilisation est identique, que les animaux soient placés ou non en conditions hypoxiques. Ce point suggère donc que la mobilisation des progéniteurs mésenchymateux serait plutôt le fait de la lésion osseuse elle-même que de l'épisode hypoxique.

Ainsi, il est clair que le processus de réparation chez les animaux opérés se met en marche dès la création du défaut chirurgical, et sollicite le recrutement des cellules ostéoprogénitrices. Toutefois, l'absence de mobilisation-hypoxie dépendante des progéniteurs mésenchymateux qui est constatée au moment du sacrifice des animaux ne signifie pas avec certitude qu'une telle mobilisation n'a pas eu lieu. En effet, nous ne pouvons pas exclure qu'une deuxième vague de mobilisation des progéniteurs mésenchymateux par l'hypoxie ait bien eu lieu, et que les progéniteurs, attirés sur le site de la lésion osseuse, se soient rapidement différenciés en cellules ostéo-formatrices, favorisant ainsi la réparation. Récemment, des résultats semblables aux nôtres ont été rapportés par un groupe américain. Chez des animaux dépourvus de lésion osseuse, l'équipe de Toupadakis montre qu'un traitement pharmacologique à l'AMD3100 pendant trois jours induit une mobilisation sanguine des CSM (Toupadakis, Granick et al. 2013). Lorsque les

animaux sont porteurs d'une fracture osseuse, le traitement à l'AMD3100 améliore la consolidation, mais ne génère plus de mobilisation sanguine de ces progéniteurs. Les auteurs suggèrent que le trauma osseux déclenche lui-même une mobilisation des CSM, que cette mobilisation est bel et bien accrue par le traitement à l'AMD3100, mais que les cellules circulantes sont rapidement attirées et captées sur le site de lésion, expliquant ainsi leur diminution dans le sang.

Les résultats obtenus au cours de la première partie de notre travail chez des animaux non opérés indiquent que la suspension limite la mobilisation des progéniteurs hématopoïétiques induite par l'hypoxie. Une même limitation de la mobilisation par la suspension a également été suggérée au niveau des progéniteurs mésenchymateux. Chez les animaux opérés, si cette interaction entre l'hypoxie et la suspension existe toujours, elle n'est plus observée au moment du sacrifice et n'a pas impacté l'effet bénéfique de l'épisode hypobare sur la réparation. Ces résultats suggèrent que l'augmentation de la mobilisation par l'hypoxie, que nous observons chez les animaux non opérés et qui est modulée par la suspension, ne pourrait pas être l'explication unique de l'effet bénéfique de l'hypoxie tardive sur la réparation osseuse. Une mobilisation et/ou une différenciation des progéniteurs initiées par l'opération elle-même est plus cohérente avec l'ensemble des données observées.

L'action bénéfique d'un épisode hypoxique appliqué aux phases tardives de la réparation pourrait également être expliquée par un effet direct au niveau des cellules déjà présentes dans le site de lésion. Un autre paramètre à prendre compte serait un mécanisme inflammatoire dont le rôle initiateur de la réparation est bien décrit (Schmidt-Bleek, Schell et al. 2012). Dans ce contexte, une analyse protéomique menée dans le surnageant médullaire de l'os opéré a mis en évidence une augmentation de la concentration en MIP-1 $\alpha$ , concomitante avec une diminution de la concentration de Dkk1, HGF et VEGF.

Macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$  (MIP-1 $\alpha$ ) est une cytokine pro-inflammatoire de faible poids moléculaire impliquée dans la régulation de la différenciation des cellules hématopoïétiques, la chemo-attraction des progéniteurs monocytaires (Bertini, Luini et al. 1995), et la différenciation des progéniteurs ostéoclastiques.

*In vitro*, MIP-1  $\alpha$  favorise la différenciation ostéoclastique (Okamoto, Kim et al. 2004), et sa synthèse est augmentée en conditions hypoxiques (Bosco, Puppo et al. 2004). En cohérence avec ces observations *in vitro*, nos résultats *in vivo* indiquent une augmentation du taux de MIP-1  $\alpha$  dans le fémur opéré couplée à une hausse des cellules ostéoclastiques dans la zone du défaut osseux chez les animaux placés en caisson hypobare. Les effets pro-ostéoclastiques de MIP-1 $\alpha$  seraient médiés par l'activation des voies de signalisation ERK1/2 et PI3K/Akt et l'inhibition de la voie MAPK p38 (Tsubaki, Kato et al. 2007).

Récemment, un nouveau rôle a été attribué à la cytokine MIP-1 $\alpha$  dans l'inhibition des ostéoblastes observée dans le cadre des myélomes multiples (Vallet, Pozzi et al. 2011). Dans cette maladie, les biopsies osseuses indiquent une augmentation de l'activité ostéoclastique corrélée à une forte diminution des ostéoblastes, ce découplage osseux étant à l'origine d'ostéolyses chez les patients (Bataille, Chappard et al. 1989). L'activité pro-ostéoclastique de MIP-1 $\alpha$  dans ce contexte est relativement bien décrite dans la littérature. Les ostéoblastes expriment les récepteurs de MIP-1 $\alpha$ . L'équipe de Vallet a montré que l'exposition des ostéoblastes différenciés à la cytokine entraîne, *via* l'activation de la voie ERK, une diminution de la minéralisation de la matrice osseuse, et une baisse de l'expression de l'ostéocalcine (Vallet, Pozzi et al. 2011). Les auteurs suggèrent que MIP-1  $\alpha$  est un bon candidat moléculaire pour expliquer le découplage osseux constaté dans le myélome multiple. Dans un contexte non pathologique, une étude plus ancienne suggère que la cytokine est exprimée par les ostéoblastes aux sites de remodelage, et qu'elle participe à l'initiation de la phase catabolique en recrutant les progéniteurs ostéoclastiques et en favorisant leur différenciation (Kukita, Nomiya et al. 1997).

Ces études suggèrent que l'accumulation de MIP-1  $\alpha$  observée dans la moelle osseuse des fémurs opérés hypoxiques est en cohérence avec l'augmentation de l'activité catabolique et la diminution de l'activité anabolique rencontrées chez les animaux placés en caisson.

Dickkopf 1 (Dkk1) est un inhibiteur spécifique de la voie de signalisation Wnt (figure ci-contre), impliquée dans la régulation de la masse osseuse. Le laboratoire d'Alman a montré que l'injection de Dkk1 directement sur le site d'une fracture osseuse retarde la réparation, et que le cal osseux est enrichi en cellules stromales non différenciées (Chen, Whetstone et al. 2007). A l'inverse, Agholme et collègues ont relaté que l'injection d'anticorps dirigés

contre Dkk1 permet une accélération de la réparation de fractures osseuses chez le rat (Agholme, Isaksson et al. 2011).

De façon similaire, un modèle murin de fracture fémorale a montré que l'administration d'anticorps anti-Dkk1 le jour même de la création de la fracture a un effet bénéfique sur la consolidation, avec une augmentation constatée du volume du cal et de la densité osseuse (Komatsu, Mary et al. 2010). Mais, les auteurs notent aussi que des animaux traités avec l'anticorps anti-Dkk1 plus tardivement, à partir du quatrième jour post-opératoire, n'améliorent pas leur réparation. Les fémurs opérés prélevés chez ces animaux répondent même moins bien aux tests biomécaniques que des fémurs témoins. L'apport bénéfique à la réparation d'un traitement avec un anticorps anti-Dkk1 est donc dépendant du moment de son administration.

La diminution de l'expression de Dkk1 mise en évidence dans le fémur opéré des animaux hypoxiques présentant une meilleure réparation osseuse est donc en cohérence avec l'ensemble de ces études.

L'Hepatocyte Growth Factor (HGF) est activé dans le cadre de la réparation osseuse. Son expression est augmentée autour de la lésion dans les phases précoces de la réparation, où il participe au recrutement des progéniteurs mésenchymateux et facilite l'expression du récepteur aux BMPs sur la membrane de ces cellules (Imai, Terai et al. 2005). Plus récemment, il a été montré *in vitro* que l'HGF gouverne l'expression de l'ostéopontine, *via* l'activation de la voie de signalisation PI3K/Akt dans les ostéoblastes (Chen, Tsou et al. 2012). La diminution constatée d'HGF dans le fémur de nos souris placées en caisson est en accord avec l'hypothèse d'une accélération de la phase anabolique vers la phase catabolique de la réparation osseuse par l'hypoxie respiratoire.

Le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) est le principal promoteur de l'angiogenèse. Sa synthèse est augmentée par l'hypoxie (Maes, 2012). Le VEGF joue un rôle capital dans le processus de réparation. L'administration de VEGF exogène chez des lapins porteurs d'un défaut segmentaire de taille critique favorise la création d'un pont osseux entre les deux extrémités de la région réséquée (Street, Bao et al. 2002). A l'inverse, le blocage de l'activité du VEGF endogène par l'injection de récepteurs solubles Flt-IgG contrarie considérablement la réparation d'un défaut fémoral chez la souris. Une diminution de l'angiogenèse au niveau

de l'hématome fracturaire est constatée, ainsi qu'une diminution de la néoformation osseuse et de la minéralisation (Street, Bao et al. 2002).

Dans le fémur opéré de nos animaux hypoxiques, une diminution du niveau d'expression du VEGF est mise en évidence. La synthèse du VEGF étant maximale dans les phases précoces de la réparation (Uchida, Sakai et al. 2003), la baisse constatée est en accord avec une accélération de la réparation osseuse par l'hypoxie tardive.

L'ensemble de ces analyses protéomiques conforte donc notre hypothèse d'une accélération du processus de la réparation générée par l'application d'un épisode hypoxique dans les phases avancées de la réparation. Si nous ne pouvons pas exclure que les effets bénéfiques de l'hypoxie passent par une mobilisation des progéniteurs ostéocompétents, il est plus probable qu'ils soient dus à des effets directs sur les cellules ostéocompétentes présentes sur le site de lésion.



### **3) Quelles pourraient être les perspectives et les retombées cliniques de ce travail ?**

Nos résultats indiquent qu'une période d'hypoxie respiratoire de quatre jours, initiée dans les phases avancées de la réparation, accélère le processus de réparation d'un défaut osseux cavitaire chez la souris. Dans notre modèle, la perte des contraintes mécaniques sur le membre opéré n'influence pas la réparation en condition normoxique, ni l'accélération de la réparation en condition hypoxique. Ces résultats suggèrent donc que l'immobilisation d'un membre accidenté, qui fait partie intégrante des protocoles thérapeutiques appliqués en clinique, ne serait pas un obstacle à l'emploi d'un épisode hypoxique comme thérapeutique.

Un premier point soulevé par nos résultats est l'importance du moment de déclenchement de l'épisode hypoxique pour l'optimisation du processus de réparation osseuse. Dans les expériences de Makley (Makley, Heiple et al. 1967) et Lu (Lu, Saless et al. 2013), le déclenchement quasi-immédiat de l'épisode hypoxique, juste après la survenue de la lésion osseuse, est défavorable au processus de réparation. En revanche, dans notre modèle, le traitement hypoxique étant initié plus tardivement, au cours de la dynamique de réparation, l'effet sur la consolidation osseuse est bénéfique. D'un point de vue thérapeutique, cela suggère qu'il existe une fenêtre temporelle de permissivité du traitement sur la réparation, qu'il serait important de mieux définir. Des expériences sur la réparation avec des délais d'application différents seraient donc à envisager. Dans la mesure où la réponse inflammatoire aigüe se met en place dans les tous premiers instants suivant l'apparition de la lésion osseuse (Opal, Thijs et al. 2000) et qu'elle est connue pour jouer un rôle important dans l'initiation de la cascade de la réparation (Schmidt-Bleek, Schell et al. 2012), l'intégration d'études sur la manière dont l'hypoxie respiratoire module la réponse inflammatoire dans le contexte de la réparation osseuse devrait être envisagée. Chez la souris, Cho et coll. ont rapporté un pic d'expression de l'IL-1 et de l'IL-6 dans les premières vingt-quatre heures post-fracture. Le niveau de ces cytokines diminue ensuite très rapidement, jusqu'à atteindre un niveau quasi-indétectable dès le troisième jour de réparation, avant l'apparition d'un second pic plus tardif vers quatorze jours (Cho, Gerstenfeld et al. 2002). Chez nos souris, au onzième jour après la lésion, nous n'avons pas détecté de cytokines IL-1 et IL-6 dans le surnageant médullaire des fémurs opérés. Toutefois,

nous n'avons pas recherché les taux systémiques de ces molécules, et il serait intéressant d'investiguer le rôle modulateur de l'hypoxie sur les cytokines inflammatoires dans le cadre de la réparation osseuse.

De façon absolument évidente, nous manquons de recul par rapport à une possible application de cette thérapeutique hypoxique hypobare à l'homme.

L'effet bénéfique d'un épisode hypoxique tardif, mis en évidence dans notre travail, a été montré sur un modèle murin de réparation intra-membranaire. Il faudrait également faire la preuve du concept de l'effet bénéfique dans un modèle de réparation endochondrale (mode de réparation des os longs), puis confirmer plus tard sur un gros animal avant de passer chez l'homme.

Dans le contexte des fracas osseux avec perte de substance tels qu'ils sont rencontrés dans le milieu militaire, les blessés sont très majoritairement des polytraumatisés. Un avantage de notre stratégie thérapeutique hypoxique serait que sa mise en œuvre ne doit pas se faire lors de la prise en charge du polytraumatisé, c'est-à-dire dans la phase critique d'urgence vitale au cours de laquelle une telle stratégie serait impossible. L'épisode hypoxique pourrait s'intégrer plus tardivement dans le protocole de soin, après stabilisation du patient.

En revanche, une thérapeutique d'hypoxie hypobare nécessiterait l'emploi d'un matériel lourd, et la présence de personnels spécialement formés à cette technique. La médecine hypobare est indissociable du milieu aéronautique. En France, elle est étudiée depuis le milieu du XXe siècle, notamment au sein de structures spécialisées de coopération civilo-militaire. De nos jours, seuls deux caissons sont en activité sur le territoire, l'un étant localisé dans le milieu civil à Marseille (société Comex), et le second appartenant au département de médecine aéronautique opérationnelle de la base aérienne 118 (Mont-de-Marsan). D'un point de vue purement pratique, la mise en œuvre d'une thérapeutique hypobare apparaît dès aujourd'hui difficile, de part la raréfaction des caissons hypobares et des personnels qualifiés pour leur exploitation.

En outre, d'un point de vue médical, une réflexion plus approfondie concernant les risques associés (dysbarismes, thromboses veineuses, embolies pulmonaires) devrait être engagée avec les praticiens concernés. En effet, de tels risques pourraient limiter l'application de cette stratégie à des patients déjà fragilisés.

Compte tenu de ces limitations, la mise en œuvre d'une hypoxie normobare (diminution de la proportion de l'O<sub>2</sub> dans le mélange gazeux respiré) semblerait plus accessible dans un cadre clinique. Elle permettrait de s'affranchir des problématiques liées aux dysbarismes, et son utilisation nécessiterait une surveillance médicale simplifiée. Toutefois, son utilisation chez des polytraumatisés, même stabilisés, n'est pas dénuée de risques notamment cardiovasculaires. Au préalable, il faudrait vérifier qu'un épisode tardif d'hypoxie normobare exerce des effets bénéfiques sur la réparation osseuse de façon similaire à l'hypoxie hypobare.

Enfin, une autre stratégie d'ordre pharmacologique pourrait être évaluée. Puisqu'il est connu que l'érythropoïétine est l'un des effecteurs importants activé par l'hypoxie, il pourrait être intéressant d'envisager le remplacement de l'hypoxie par un traitement à l'Epo. En clinique, des traitements à l'Epo ont déjà été menés chez des patients polytraumatisés dans un contexte transfusionnel (Corwin, Gettinger et al. 2007). L'injection d'Epo permettrait de diminuer le nombre de transfusions sanguines chez des patients en réanimation, réduisant ainsi les risques d'infections nosocomiales et de mortalité (Silver, Corwin et al. 2006) (Corwin, Gettinger et al. 2002).

En revanche, il semblerait, en discutant avec des praticiens réanimateurs hospitaliers, qu'il existe une interaction entre l'Epo et les cytokines du syndrome inflammatoire qui pourrait limiter l'efficacité du traitement à l'érythropoïétine. Ces points devraient être intégrés dans une future étude concernant la réparation osseuse. Nos résultats préliminaires obtenus au sein du laboratoire semblent montrer un effet bénéfique d'un traitement à l'Epo sur la réparation d'un défaut osseux cavitaires chez la souris. Les travaux vont être poursuivis pour analyser le mécanisme d'action de l'Epo dans ce processus.

**En conclusion, la réparation osseuse est un processus complexe et dynamique, mettant en jeu des interactions entre cellules des lignées hématopoïétique et mésenchymateuse.**

**Les résultats obtenus au cours de mon travail de thèse montrent que cette composante dynamique de la réparation est essentielle à prendre en compte dans les protocoles d'amélioration de la réparation osseuse. Notre travail montre également que la définition d'une fenêtre temporelle de permissivité du traitement, de type hypoxique hypobarique tardif (ou son équivalent), est importante pour optimiser le processus de réparation.**

## Références bibliographiques

- Adams, G. B., K. T. Chabner, I. R. Alley, D. P. Olson, Z. M. Szczepiorkowski, M. C. Poznansky, C. H. Kos, M. R. Pollak, E. M. Brown and D. T. Scadden (2006). "Stem cell engraftment at the endosteal niche is specified by the calcium-sensing receptor." Nature **439**(7076): 599-603.
- Agholme, F., H. Isaksson, S. Kuhstoss and P. Aspenberg (2011). "The effects of Dickkopf-1 antibody on metaphyseal bone and implant fixation under different loading conditions." Bone **48**(5): 988-996.
- Aguirre, J. I., M. E. Leal, M. F. Rivera, S. M. Vanegas, M. Jorgensen and T. J. Wronski (2007). "Effects of basic fibroblast growth factor and a prostaglandin E2 receptor subtype 4 agonist on osteoblastogenesis and adipogenesis in aged ovariectomized rats." J Bone Miner Res **22**(6): 877-888.
- Aguirre, J. I., L. I. Plotkin, S. A. Stewart, R. S. Weinstein, A. M. Parfitt, S. C. Manolagas and T. Bellido (2006). "Osteocyte Apoptosis Is Induced by Weightlessness in Mice and Precedes Osteoclast Recruitment and Bone Loss." J Bone Miner Res **21**: 605-615.
- Aiuti, A., I. Webb, C. Bleul, T. Springer and J. Gutierrez-Ramos (1997). "The chemokine SDF-1 is a chemoattractant for human CD341 hematopoietic progenitor cells and provides a new mechanism to explain the mobilization of CD341 progenitors to peripheral blood." J Exp Med. **185**: 111-120.
- Alford, A. I. and K. D. Hankenson (2006). "Matricellular proteins: Extracellular modulators of bone development, remodeling, and regeneration." Bone **38**(6): 749-757.
- Amblard, D., M.-H. Lafage-Proust, A. Laib, T. Thomas, P. Rügsegger, C. Alexandre and L. Vico (2003). "Tail Suspension Induces Bone Loss in Skeletally Mature Mice in the C57BL/6J Strain but Not in the C3H/HeJ Strain." Journal of Bone and Mineral Research **18**: 561-569.
- Anagnostou, A., E. S. Lee, N. Kessimian, R. Levinson and M. Steiner (1990). "Erythropoietin has a mitogenic and positive chemotactic effect on endothelial cells." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(15): 5978-5982.
- Anderson, H., J. Sipe, L. Hessle, R. Dharmamraju, E. Atti, N. Camacho and J. Millan (2004). "Impaired calcification around matrix vesicles of growth plate and bone in alkaline-phosphatase deficient mice." Am J Pathol **164**(3): 841-847.
- Arai, F., A. Hirao, M. Ohmura, H. Sato, S. Matsuoka, K. Takubo, K. Ito, G. Y. Koh and T. Suda (2004). "Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche." Cell **118**(2): 149-161.
- Arai, F. and T. Suda (2007). "Maintenance of quiescent hematopoietic stem cells in the osteoblastic niche." Ann N Y Acad Sci **1106**: 41-53.
- Arnett, T. R., D. C. Gibbons, J. C. Utting, I. R. Orriss, A. Hoebertz, M. Rosendaal and S. Meghji (2003). "Hypoxia is a major stimulator of osteoclast formation and bone resorption." J Cell Physiol **196**(1): 2-8.
- Asada, N., Y. Katayama, M. Sato, K. Minagawa, K. Wakahashi, H. Kawano, Y. Kawano, A. Sada, K. Ikeda, T. Matsui and M. Tanimoto (2013). "Matrix-embedded osteocytes regulate mobilization of hematopoietic stem/progenitor cells." Cell Stem Cell **12**(6): 737-747.
- Aubin, J. E. (1998). "Advances in the osteoblast lineage." Biochem Cell Biol **76**(6): 899-910.

- Aubin, J. E. and E. Bonnellye (2000). "Osteoprotegerin and its ligand: a new paradigm for regulation of osteoclastogenesis and bone resorption." Osteoporos Int **11**(11): 905-913.
- Avalos, B. R. (1996). "Molecular analysis of the granulocyte colony-stimulating factor receptor." Blood **88**(3): 761-777.
- Avecilla, S. T., K. Hattori, B. Heissig, R. Tejada, F. Liao, K. Shido, D. K. Jin, S. Dias, F. Zhang, T. E. Hartman, N. R. Hackett, R. G. Crystal, L. Witte, D. J. Hicklin, P. Bohlen, D. Eaton, D. Lyden, F. de Sauvage and S. Rafii (2004). "Chemokine-mediated interaction of hematopoietic progenitors with the bone marrow vascular niche is required for thrombopoiesis." Nat Med **10**(1): 64-71.
- Azuma, Y., K. Kaji, R. Katogi, S. Takeshita and A. Kudo (2000). "Tumor necrosis factor-alpha induces differentiation of and bone resorption by osteoclasts." J Biol Chem **275**(7): 4858-4864.
- Balcerzak, M., E. Hamade, L. Zhang, S. Pikula, G. Azzar, J. Radisson, J. Bandorowicz-Pikula and R. Buchet (2003). "The roles of annexins and alkaline phosphatase in mineralization process." Acta Biochim Pol **50**(4): 1019-1038.
- Barker, J. E. (1997). "Early transplantation to a normal microenvironment prevents the development of Steel hematopoietic stem cell defects." Exp Hematol **25**(6): 542-547.
- Baron, R. (1999). Anatomy and ultrastructure of bone. Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism M. Favus, Lippincott Williams and Wilkins, USA: 3-10.
- Basciano, L., C. Nemos, B. Foliguet, N. de Isla, M. de Carvalho, N. Tran and A. Dalloul (2011). "Long term culture of mesenchymal stem cells in hypoxia promotes a genetic program maintaining their undifferentiated and multipotent status." BMC Cell Biol **12**: 12.
- Basso, N., Y. Jia, C. G. Bellows and J. N. Heersche (2005). "The effect of reloading on bone volume, osteoblast number, and osteoprogenitor characteristics: studies in hind limb unloaded rats." Bone **37**(3): 370-378.
- Bataille, R., D. Chappard, C. Marcelli, P. Dessauw, J. Sany, P. Baldet and C. Alexandre (1989). "Mechanisms of bone destruction in multiple myeloma: the importance of an unbalanced process in determining the severity of lytic bone disease." J Clin Oncol **7**(12): 1909-1914.
- Bellows, C. G., S. M. Reimers and J. N. Heersche (1999). "Expression of mRNAs for type-I collagen, bone sialoprotein, osteocalcin, and osteopontin at different stages of osteoblastic differentiation and their regulation by 1,25 dihydroxyvitamin D3." Cell Tissue Res **297**(2): 249-259.
- Bentzon, J. F., K. Stenderup, F. D. Hansen, H. D. Schroder, B. M. Abdallah, T. G. Jensen and M. Kassem (2005). "Tissue distribution and engraftment of human mesenchymal stem cells immortalized by human telomerase reverse transcriptase gene." Biochem Biophys Res Commun **330**(3): 633-640.
- Bertini, R., W. Luini, S. Sozzani, B. Bottazzi, P. Ruggiero, D. Boraschi, D. Saggiaro, L. Chieco-Bianchi, P. Proost, J. van Damme and et al. (1995). "Identification of MIP-1 alpha/LD78 as a monocyte chemoattractant released by the HTLV-I-transformed cell line MT4." AIDS Res Hum Retroviruses **11**(1): 155-160.
- Bhatia, M., D. Bonnet, B. Murdoch, O. I. Gan and J. E. Dick (1998). "A newly discovered class of human hematopoietic cells with SCID-repopulating activity." Nat Med **4**(9): 1038-1045.

- Bianco, P., P. G. Robey and P. J. Simmons (2008). "Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays." Cell Stem Cell **2**(4): 313-319.
- Bielby, R., E. Jones and D. McGonagle (2007). "The role of mesenchymal stem cells in maintenance and repair of bone." Injury **38 Suppl 1**: S26-32.
- Bishop, A. (2008). "Role of oxygen in wound healing." J Wound Care **17**(9): 399-402.
- Blair, H. C., S. L. Teitelbaum, R. Ghiselli and S. Gluck (1989). "Osteoclastic bone resorption by a polarized vacuolar proton pump." Science **245**(4920): 855-857.
- Bonewald, L. F. (2006). "Mechanosensation and Transduction in Osteocytes." Bonekey Osteovision **3**(10): 7-15.
- Bonewald, L. F. (2011). "The Amazing Osteocyte." Journal of Bone and Mineral Research **26**(2): 229-238.
- Bosco, M. C., M. Puppo, S. Pastorino, Z. Mi, G. Melillo, S. Massazza, A. Rapisarda and L. Varesio (2004). "Hypoxia selectively inhibits monocyte chemoattractant protein-1 production by macrophages." J Immunol **172**(3): 1681-1690.
- Boyle, W. J., W. S. Simonet and D. L. Lacey (2003). "Osteoclast differentiation and activation." Nature **423**(6937): 337-342.
- Brahimi-Horn, M. C., J. Chiche and J. Pouyssegur (2007). "Hypoxia signalling controls metabolic demand." Curr Opin Cell Biol **19**(2): 223-229.
- Brinker, M. R. and D. E. Bailey, Jr. (1997). "Fracture healing in tibia fractures with an associated vascular injury." J Trauma **42**(1): 11-19.
- Bunn, H. F. and R. O. Poyton (1996). "Oxygen sensing and molecular adaptation to hypoxia." Physiol Rev **76**(3): 839-885.
- Burg, K. J., S. Porter and J. F. Kellam (2000). "Biomaterial developments for bone tissue engineering." Biomaterials **21**(23): 2347-2359.
- Caillot-Augusseau, A., L. Vico, M. Heer, D. Voroviev, J. C. Souberbielle, A. Zitterman, C. Alexandre and M. H. Lafage-Proust (2000). "Space flight is associated with rapid decreases of undercarboxylated osteocalcin and increases of markers of bone resorption without changes in their circadian variation: observations in two cosmonauts." Clin Chem **46**(8 Pt 1): 1136-1143.
- Calvi, L. M., G. B. Adams, K. W. Weibrecht, J. M. Weber, D. P. Olson, M. C. Knight, R. P. Martin, E. Schipani, P. Divieti, F. R. Bringhurst, L. A. Milner, H. M. Kronenberg and D. T. Scadden (2003). "Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche." Nature **425**(6960): 841-846.
- Canalis, E., M. Centrella and T. McCarthy (1988). "Effects of basic fibroblast growth factor on bone formation in vitro." J Clin Invest **81**(5): 1572-1577.
- Cao, H., S. Yu, Z. Yao, D. L. Galson, Y. Jiang, X. Zhang, J. Fan, B. Lu, Y. Guan, M. Luo, Y. Lai, Y. Zhu, N. Kurihara, K. Patrene, G. D. Roodman and G. Xiao (2010). "Activating transcription factor 4 regulates osteoclast differentiation in mice." J Clin Invest **120**(8): 2755-2766.
- Carano, R. A. and E. H. Filvaroff (2003). "Angiogenesis and bone repair." Drug Discov Today **8**(21): 980-989.
- Carnot, P. and C. Deflandre (1906). "Sur l'activité hémopoïétique du sérum au cours de la régénération du sang." C. R. Acad. Sci. Paris (143): 384-386.
- Cayatte, A. J., L. Kumbla and M. T. Subbiah (1990). "Marked acceleration of exogenous fatty acid incorporation into cellular triglycerides by fetuin." J Biol Chem **265**(10): 5883-5888.

- Ceradini, D. and G. Geoffrey (2005). "Homing to Hypoxia: HIF-1 as a Mediator of Progenitor Cell Recruitment to Injured Tissue." Trends Cardiovasc Med **15**: 57–63.
- Ceradini, D. J., A. R. Kulkarni, M. J. Callaghan, O. M. Tepper, N. Bastidas, M. E. Kleinman, J. M. Capla, R. D. Galiano, J. P. Levine and G. C. Gurtner (2004). "Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1." Nat Med **10**(8): 858-864.
- Chambers, T. J. and K. Fuller (1985). "Bone cells predispose bone surfaces to resorption by exposure of mineral to osteoclastic contact." J Cell Sci **76**: 155-165.
- Chang, H., C. W. Brown and M. M. Matzuk (2002). "Genetic analysis of the mammalian transforming growth factor-beta superfamily." Endocr Rev **23**(6): 787-823.
- Chang, M. K., L. J. Raggatt, K. A. Alexander, J. S. Kuliwaba, N. L. Fazzalari, K. Schroder, E. R. Maylin, V. M. Ripoll, D. A. Hume and A. R. Pettit (2008). "Osteal tissue macrophages are intercalated throughout human and mouse bone lining tissues and regulate osteoblast function in vitro and in vivo." J Immunol **181**(2): 1232-1244.
- Charnley, J. and S. Baker (1952). "Compression arthrodesis of the knee; a clinical and histological study." J Bone Joint Surg Br **34-B**: 187-199.
- Chatterjea, A., G. Meijer, C. v. Blitterswijk and J. d. Boer (2010). "Clinical Application of Human Mesenchymal Stromal Cells for Bone Tissue Engineering." Stem Cells International **2010**.
- Chauvin, F., L. P. Fischer, F. Mottier, J. J. Ferrandis, X. Tabbagh and C. Gargar "La Chirurgie osseuse pendant la Grande Guerre."
- Chelnaya, N. (1991). "Effect of space flight of varying duration upon rat blood and bone marrow." Biosatellites Cosmos Abstracts, Leningrad **12-15 August**: 126-128.
- Chen, D., Y. Li, Z. Zhou, C. Wu, Y. Xing, X. Zou, W. Tian and C. Zhang (2013). "HIF-1 $\alpha$  inhibits Wnt signaling pathway by activating Sost expression in osteoblasts." PLoS One **8**(6): e65940.
- Chen, D., Y. Li, Z. Zhou, Y. Xing, Y. Zhong, X. Zou, W. Tian and C. Zhang (2012). "Synergistic inhibition of Wnt pathway by HIF-1 $\alpha$  and osteoblast-specific transcription factor osterix (Osx) in osteoblasts." PLoS One **7**(12): e52948.
- Chen, H. T., H. K. Tsou, C. H. Chang and C. H. Tang (2012). "Hepatocyte growth factor increases osteopontin expression in human osteoblasts through PI3K, Akt, c-Src, and AP-1 signaling pathway." PLoS One **7**(6): e38378.
- Chen, Q., H. Kaji, M. Kanatani, T. Sugimoto and K. Chihara (2004). "Testosterone increases osteoprotegerin mRNA expression in mouse osteoblast cells." Horm Metab Res **36**(10): 674-678.
- Chen, Y., H. C. Whetstone, A. C. Lin, P. Nadesan, Q. Wei, R. Poon and B. A. Alman (2007). "Beta-catenin signaling plays a disparate role in different phases of fracture repair: implications for therapy to improve bone healing." PLoS Med **4**(7): e249.
- Cheng, H., W. Jiang, F. M. Phillips, R. C. Haydon, Y. Peng, L. Zhou, H. H. Luu, N. An, B. Breyer, P. Vanichakarn, J. P. Szatkowski, J. Y. Park and T. C. He (2003). "Osteogenic activity of the fourteen types of human bone morphogenetic proteins (BMPs)." J Bone Joint Surg Am **85-A**(8): 1544-1552.
- Cherian, P. P., B. Cheng, S. Gu, E. Sprague, L. F. Bonewald and J. X. Jiang (2003). "Effects of mechanical strain on the function of Gap junctions in osteocytes are mediated through the prostaglandin EP2 receptor." J Biol Chem **278**(44): 43146-43156.

- Cho, T. J., L. C. Gerstenfeld and T. A. Einhorn (2002). "Differential temporal expression of members of the transforming growth factor beta superfamily during murine fracture healing." J Bone Miner Res **17**(3): 513-520.
- Choudhary, S., P. Halbout, C. Alander, L. Raisz and C. Pilbeam (2007). "Strontium ranelate promotes osteoblastic differentiation and mineralization of murine bone marrow stromal cells: involvement of prostaglandins." J Bone Miner Res **22**(7): 1002-1010.
- Chow, A., D. Lucas, A. Hidalgo, S. Mendez-Ferrer, D. Hashimoto, C. Scheiermann, M. Battista, M. Leboeuf, C. Prophete, N. van Rooijen, M. Tanaka, M. Merad and P. S. Frenette (2011). "Bone marrow CD169+ macrophages promote the retention of hematopoietic stem and progenitor cells in the mesenchymal stem cell niche." J Exp Med **208**(2): 261-271.
- Civitelli, R. (2008). "Cell-cell communication in the osteoblast/osteocyte lineage." Arch Biochem Biophys **473**(2): 188-192.
- Clarke, B. (2008). "Normal bone anatomy and physiology." Clin J Am Soc Nephrol **3** Suppl 3: S131-139.
- Collin-Osdoby, P., L. Rothe, S. Bekker, F. Anderson, Y. Huang and P. Osdoby (2002). "Basic fibroblast growth factor stimulates osteoclast recruitment, development, and bone pit resorption in association with angiogenesis in vivo on the chick chorioallantoic membrane and activates isolated avian osteoclast resorption in vitro." J Bone Miner Res **17**(10): 1859-1871.
- Colton, C. L., A. F. Dell'Oca, U. Holz, J. F. Kellam and P. E. Ochsner, Eds. (2000). AO Principles of Fracture Management.
- Cornell, C. N. (1999). "Osteoconductive materials and their role as substitutes for autogenous bone grafts." Orthop Clin North Am **30**(4): 591-598.
- Corwin, H. L., A. Gettinger, T. C. Fabian, A. May, R. G. Pearl, S. Heard, R. An, P. J. Bowers, P. Burton, M. A. Klausner and M. J. Corwin (2007). "Efficacy and safety of epoetin alfa in critically ill patients." N Engl J Med **357**(10): 965-976.
- Corwin, H. L., A. Gettinger, R. G. Pearl, M. P. Fink, M. M. Levy, M. J. Shapiro, M. J. Corwin and T. Colton (2002). "Efficacy of recombinant human erythropoietin in critically ill patients: a randomized controlled trial." JAMA **288**(22): 2827-2835.
- Cross, J. D., A. E. Johnson, J. C. Wenke, M. J. Bosse and J. R. Ficke (2011). "Mortality in female war veterans of operations enduring freedom and Iraqi freedom." Clin Orthop Relat Res **469**(7): 1956-1961.
- Cypher, T. J. and J. P. Grossman (1996). "Biological Principles of Bone Graft Healing." The Journal of Foot and Ankle Surgery **35**(5): 413-417.
- da Silva Meirelles, L., P. C. Chagastelles and N. B. Nardi (2006). "Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues." J Cell Sci **119**(Pt 11): 2204-2213.
- David, V., M. H. Lafage-Proust, N. Laroche, A. Christian, P. Rueggsegger and L. Vico (2006). "Two-week longitudinal survey of bone architecture alteration in the hindlimb-unloaded rat model of bone loss: sex differences." Am J Physiol Endocrinol Metab **290**(3): E440-447.
- Deckers, M. M., R. L. van Bezooijen, G. van der Horst, J. Hoogendam, C. van Der Bent, S. E. Papapoulos and C. W. Lowik (2002). "Bone morphogenetic proteins stimulate angiogenesis through osteoblast-derived vascular endothelial growth factor A." Endocrinology **143**(4): 1545-1553.
- Dehority, W., B. P. Halloran, D. D. Bikle, T. Curren, P. J. Kostenuik, T. J. Wronski, Y. Shen, B. Rabkin, A. Bouraoui and E. Morey-Holton (1999). "Bone and hormonal changes



- induced by skeletal unloading in the mature male rat." *Am J Physiol* **276**(1 Pt 1): E62-69.
- Del Fattore, A., B. Peruzzi, N. Rucci, I. Recchia, A. Cappariello, M. Longo, D. Fortunati, P. Ballanti, M. Iacobini, M. Luciani, R. Devito, R. Pinto, M. Caniglia, E. Lanino, C. Messina, S. Cesaro, C. Letizia, G. Bianchini, H. Fryssira, P. Grabowski, N. Shaw, N. Bishop, D. Hughes, R. P. Kapur, H. K. Datta, A. Taranta, R. Fornari, S. Migliaccio and A. Teti (2006). "Clinical, genetic, and cellular analysis of 49 osteopetrotic patients: implications for diagnosis and treatment." *J Med Genet* **43**(4): 315-325.
- Deng, J., Z. M. Zou, T. L. Zhou, Y. P. Su, G. P. Ai, J. P. Wang, H. Xu and S. W. Dong (2011). "Bone marrow mesenchymal stem cells can be mobilized into peripheral blood by G-CSF in vivo and integrate into traumatically injured cerebral tissue." *Neurol Sci* **32**(4): 641-651.
- Desoutter, J., R. Mentaverri, M. Brazier and S. Kamel (2012). "Le remodelage osseux normal et pathologique " *Revue francophone des laboratoires* **42**(446).
- Dickson, K. F., S. Katzman and G. Paiement (1995). "The importance of the blood supply in the healing of tibial fractures." *Contemp Orthop* **30**(6): 489-493.
- Dimitriou, R., G. I. Mataliotakis, A. G. Angoules, N. K. Kanakaris and P. V. Giannoudis (2011). "Complications following autologous bone graft harvesting from the iliac crest and using the RIA: a systematic review." *Injury* **42 Suppl 2**: S3-15.
- Ding, L., T. L. Saunders, G. Enikolopov and S. J. Morrison (2012). "Endothelial and perivascular cells maintain haematopoietic stem cells." *Nature* **481**(7382): 457-462.
- Doan, P. L. and J. P. Chute (2012). "The vascular niche: home for normal and malignant hematopoietic stem cells." *Leukemia* **26**(1): 54-62.
- Dobnig, H. and R. T. Turner (1995). "Evidence that intermittent treatment with parathyroid hormone increases bone formation in adult rats by activation of bone lining cells." *Endocrinology* **136**(8): 3632-3638.
- Donat, N., P. Clapson and B. Debien (2009). "Le blessé des conflits actuels : épidémiologie des blessures de Guerre." *La revue du CARUM- Réanoxyo* **25**.
- Ducy, P. (2000). "Cbfa1: a molecular switch in osteoblast biology." *Dev Dyn* **219**(4): 461-471.
- Duncan, R. L. and C. H. Turner (1995). "Mechanotransduction and the functional response of bone to mechanical strain." *Calcif Tissue Int* **57**(5): 344-358.
- Durnova, G. N., A. S. Kaplanskii and V. V. Portugalov (1977). "[Changes in the lymphoid organs of rats during space flight]." *Arkh Anat Gistol Embriol* **72**(5): 14-20.
- Eghbali-Fatourehchi, G. Z., U. I. Modder, N. Charatcharoenwitthaya, A. Sanyal, A. H. Undale, J. A. Clowes, J. E. Tarara and S. Khosla (2007). "Characterization of circulating osteoblast lineage cells in humans." *Bone* **40**(5): 1370-1377.
- Ek-Rylander, B., M. Flores, M. Wendel, D. Heinegard and G. Andersson (1994). "Dephosphorylation of osteopontin and bone sialoprotein by osteoclastic tartrate-resistant acid phosphatase. Modulation of osteoclast adhesion in vitro." *J Biol Chem* **269**(21): 14853-14856.
- Eliasson, P. and J. I. Jonsson (2010). "The hematopoietic stem cell niche: low in oxygen but a nice place to be." *J Cell Physiol* **222**(1): 17-22.
- Eliasson, P., M. Rehn, P. Hammar, P. Larsson, O. Sirenko, L. A. Flippin, J. Cammenga and J. I. Jonsson (2010). "Hypoxia mediates low cell-cycle activity and increases the proportion of long-term-reconstituting hematopoietic stem cells during in vitro culture." *Exp Hematol* **38**(4): 301-310 e302.

- Epari, D. R., W. R. Taylor, M. O. Heller and G. N. Duda (2006). "Mechanical conditions in the initial phase of bone healing." Clin Biomech (Bristol, Avon) **21**(6): 646-655.
- Eriksen, E. F., F. Melsen and L. Mosekilde (1984). "Reconstruction of the resorptive site in iliac trabecular bone: a kinetic model for bone resorption in 20 normal individuals." Metab Bone Dis Relat Res **5**(5): 235-242.
- Erlebacher, A., E. H. Filvaroff, J. Q. Ye and R. Derynck (1998). "Osteoblastic responses to TGF-beta during bone remodeling." Mol Biol Cell **9**(7): 1903-1918.
- Everts, V., J. M. Delaisse, W. KORPER, D. C. JANSEN, W. TIGCHELAAR-GUTTER, P. SAFTIG and W. BEERTSEN (2002). "The Bone Lining Cell: Its Role in Cleaning Howship's Lacunae and Initiating Bone Formation." Journal of Bone and Mineral Research **17**(1): 77-90.
- Falany, M. L., A. M. Thames, 3rd, J. M. McDonald, H. C. Blair, M. A. McKenna, R. E. Moore, M. K. Young and J. P. Williams (2001). "Osteoclasts secrete the chemotactic cytokine mim-1." Biochem Biophys Res Commun **281**(1): 180-185.
- Fehrer, C., R. Brunauer, G. Laschober, H. Unterluggauer, S. Reitingner, F. Kloss, C. Gully, R. Gassner and G. Lepperdinger (2007). "Reduced oxygen tension attenuates differentiation capacity of human mesenchymal stem cells and prolongs their lifespan." Aging Cell **6**(6): 745-757.
- Ferrandis, J.-J. and A. Ségal (2009). "L'essor de la radiologie osseuse pendant la guerre de 1914-1918."
- Ferron, M., J. Wei, T. Yoshizawa, A. Del Fattore, R. A. DePinho, A. Teti, P. Ducy and G. Karsenty (2010). "Insulin signaling in osteoblasts integrates bone remodeling and energy metabolism." Cell **142**(2): 296-308.
- Finkemeier, C. G. (2002). "Bone-grafting and bone-graft substitutes." J Bone Joint Surg Am **84-A**(3): 454-464.
- Forwood, M. R. and C. H. Turner (1995). "Skeletal adaptations to mechanical usage: results from tibial loading studies in rats." Bone **17**(4 Suppl): 197S-205S.
- Franz-Odenaal, T. A., B. K. Hall and P. E. Witten (2006). "Buried alive: how osteoblasts become osteocytes." Dev Dyn **235**(1): 176-190.
- Friedenstein, A. J., R. K. Chailakhjan and K. S. Lalykina (1970). "The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells." Cell Tissue Kinet **3**(4): 393-403.
- Frost, H. M. (1987). "Bone "mass" and the "mechanostat": a proposal." Anat Rec **219**(1): 1-9.
- Fu, Q., R. L. Jilka, S. C. Manolagas and C. A. O'Brien (2002). "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**(50): 48868-48875.
- Fujisaki, J., J. Wu, A. L. Carlson, L. Silberstein, P. Putheti, R. Larocca, W. Gao, T. I. Saito, C. Lo Celso, H. Tsuyuzaki, T. Sato, D. Cote, M. Sykes, T. B. Strom, D. T. Scadden and C. P. Lin (2011). "In vivo imaging of Treg cells providing immune privilege to the haematopoietic stem-cell niche." Nature **474**(7350): 216-219.
- Fukuoka, H., M. Aoyama, K. Miyazawa, K. Asai and S. Goto (2005). "Hypoxic stress enhances osteoclast differentiation via increasing IGF2 production by non-osteoclastic cells." Biochem Biophys Res Commun **328**(4): 885-894.
- Fulzele, K., D. S. Krause, C. Panaroni, V. Saini, K. J. Barry, X. Liu, S. Lotinun, R. Baron, L. Bonewald, J. Q. Feng, M. Chen, L. S. Weinstein, J. Y. Wu, H. M. Kronenberg, D. T. Scadden and P. Divieti Pajevic (2013). "Myelopoiesis is regulated by osteocytes through Gsalpha-dependent signaling." Blood **121**(6): 930-939.

- Galli, C., G. Passeri and G. M. Macaluso (2010). "Osteocytes and WNT: the mechanical control of bone formation." J Dent Res **89**(4): 331-343.
- Garcia, P., A. Pieruschka, M. Klein, A. Tami, T. Histing, J. H. Holstein, C. Scheuer, T. Pohlemann and M. D. Menger (2012). "Temporal and spatial vascularization patterns of unions and nonunions: role of vascular endothelial growth factor and bone morphogenetic proteins." J Bone Joint Surg Am **94**(1): 49-58.
- Garimella, R., M. A. Kacena, S. E. Tague, J. Wang, M. C. Horowitz and H. C. Anderson (2007). "Expression of bone morphogenetic proteins and their receptors in the bone marrow megakaryocytes of GATA-1(low) mice: a possible role in osteosclerosis." J Histochem Cytochem **55**(7): 745-752.
- Garnett, J. and P. Dieppe (1990). "The effects of serum and human albumin on calcium hydroxyapatite crystal growth." Biochem J **266**(3): 863-868.
- Garrett, R. W. and S. G. Emerson (2008). "The role of parathyroid hormone and insulin-like growth factors in hematopoietic niches: physiology and pharmacology." Mol Cell Endocrinol **288**(1-2): 6-10.
- Gehron Robey, P. (1989). "The biochemistry of bone." Endocrinol Metab Clin North Am **18**(4): 858-902.
- Gerstenfeld, L. C., D. M. Cullinane, G. L. Barnes, D. T. Graves and T. A. Einhorn (2003). "Fracture healing as a post-natal developmental process: molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation." J Cell Biochem **88**(5): 873-884.
- Ghezzi, P., C. A. Dinarello, M. Bianchi, M. E. Rosandich, J. E. Repine and C. W. White (1991). "Hypoxia increases production of interleukin-1 and tumor necrosis factor by human mononuclear cells." Cytokine **3**(3): 189-194.
- Giannoudis, P. V., H. Dinopoulos and E. Tsiridis (2005). "Bone substitutes: an update." Injury, Int. J. Care Injured **36**(5): S20-S27.
- Gidado, S., W. S. Khan and D. R. Marsh (2009). "The Effect of Changes in Oxygen Tension During Fracture Repair on Mesenchymal Stem Cell and Bone Activities." Current Research Journal of Biological Sciences **1**(1): 7-10.
- Gilbert, L., X. He, P. Farmer, J. Rubin, H. Drissi, A. J. van Wijnen, J. B. Lian, G. S. Stein and M. S. Nanes (2002). "Expression of the osteoblast differentiation factor RUNX2 (Cbfa1/AML3/Pebp2alpha A) is inhibited by tumor necrosis factor-alpha." J Biol Chem **277**(4): 2695-2701.
- Giudicelli, J. and J. Souberbielle (1998). "Le remodelage osseux et l'exploration de l'ostéoporose." Revue de l'ACOMEN **4**(3).
- Gluck, T. (1891). "Referat uber die durch das modern chirurgische." Archiv fur klinische chirurgie: 41-187.
- Granero-Molto, F., J. A. Weis, M. I. Miga, B. Landis, T. J. Myers, L. O'Rear, L. Longobardi, E. D. Jansen, D. P. Mortlock and A. Spagnoli (2009). "Regenerative effects of transplanted mesenchymal stem cells in fracture healing." Stem Cells **27**(8): 1887-1898.
- Grano, M., F. Galimi, G. Zambonin, S. Colucci, E. Cottone, A. Z. Zallone and P. M. Comoglio (1996). "Hepatocyte growth factor is a coupling factor for osteoclasts and osteoblasts in vitro." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(15): 7644-7648.
- Grayson, W. L., F. Zhao, B. Bunnell and T. Ma (2007). "Hypoxia enhances proliferation and tissue formation of human mesenchymal stem cells." Biochem Biophys Res Commun **358**(3): 948-953.

- Greenbaum, A. M., L. D. Revollo, J. R. Woloszynek, R. Civitelli and D. C. Link (2012). "N-cadherin in osteolineage cells is not required for maintenance of hematopoietic stem cells." Blood **120**(2): 295-302.
- Griffon, D. (2005). Fracture healing AO principles of fracture management in small animals.
- Gu, G., M. Mulari, Z. Peng, T. A. Hentunen and H. K. Vaananen (2005). "Death of osteocytes turns off the inhibition of osteoclasts and triggers local bone resorption." Biochem Biophys Res Commun **335**(4): 1095-1101.
- Guerrouahen, B. S., I. Al-Hijji and A. R. Tabrizi (2011). "Osteoblastic and vascular endothelial niches, their control on normal hematopoietic stem cells, and their consequences on the development of leukemia." Stem Cells Int **2011**: 375857.
- Guitart, A. V., C. Debeissat, F. Hermitte, A. Villacreces, Z. Ivanovic, H. Boeuf and V. Praloran (2011). "Very low oxygen concentration (0.1%) reveals two FDCP-Mix cell subpopulations that differ by their cell cycling, differentiation and p27KIP1 expression." Cell Death Differ **18**(1): 174-182.
- Haapasalo, H., S. Kontulainen, H. Sievanen, P. Kannus, M. Jarvinen and I. Vuori (2000). "Exercise-induced bone gain is due to enlargement in bone size without a change in volumetric bone density: a peripheral quantitative computed tomography study of the upper arms of male tennis players." Bone **27**(3): 351-357.
- Hainsworth, R., M. J. Drinkhill and M. Rivera-Chira (2007). "The autonomic nervous system at high altitude." Clin Auton Res **17**(1): 13-19.
- Ham, A. W. and C. R. Leeson (1969). Histology. Tokyo, J B Lippincott.
- Hanada, K., J. E. Dennis and A. I. Caplan (1997). "Stimulatory effects of basic fibroblast growth factor and bone morphogenetic protein-2 on osteogenic differentiation of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells." J Bone Miner Res **12**(10): 1606-1614.
- Harada, S., J. A. Nagy, K. A. Sullivan, K. A. Thomas, N. Endo, G. A. Rodan and S. B. Rodan (1994). "Induction of vascular endothelial growth factor expression by prostaglandin E2 and E1 in osteoblasts." J Clin Invest **93**(6): 2490-2496.
- Harada, S. I., R. Balena, G. A. Rodan and S. B. Rodan (1995). "The role of prostaglandins in bone formation." Connect Tissue Res **31**(4): 279-282.
- Harris, A. L. (2002). "Hypoxia--a key regulatory factor in tumour growth." Nat Rev Cancer **2**(1): 38-47.
- Harris, W. (1990). Fracture healing. Canine Orthopedics 2nd Edition  
Section III : Preparation, principles and procedures for surgery. W. WG. Philadelphia, Lea & Febiger.
- Hauge, E. M., D. Qvesel, E. F. Eriksen, L. Mosekilde and F. Melsen (2001). "Cancellous bone remodeling occurs in specialized compartments lined by cells expressing osteoblastic markers." J Bone Miner Res **16**(9): 1575-1582.
- Haus-Cheymol R, C. Bouguerra, E. Mayorg, P. Nivoix, N. Prat, C. Verret, S. Duron, A. Mayet, J.-B. Meynard, V. Pommier de Santi, C. Decam, F. Pons and R. Migliani (2011). "Blessures par arme à feu et engins explosifs dans les armées. Résultats de la surveillance épidémiologique de 2004 à 2008." médecine et armées **39**(1): 89-96.
- Hazenber, J. G., M. Freeley, E. Foran, T. C. Lee and D. Taylor (2006). "Microdamage: a cell transducing mechanism based on ruptured osteocyte processes." J Biomech **39**(11): 2096-2103.

- He, Y.-X., G. Zhang, X.-H. Pan, Z. Liu, L.-z. Zheng, C.-W. Chan, K.-M. Lee, Y.-P. Cao, G. Li, L. Wei, L.-K. Hung, K.-S. Leung and L. Qin (2011). "Impaired bone healing pattern in mice with ovariectomy-induced osteoporosis: A drill-hole defect model." Bone **48**: 1388-1400.
- He, Y. X., G. Zhang, X. H. Pan, Z. Liu, L. Z. Zheng, C. W. Chan, K. M. Lee, Y. P. Cao, G. Li, L. Wei, L. K. Hung, K. S. Leung and L. Qin (2011). "Impaired bone healing pattern in mice with ovariectomy-induced osteoporosis: A drill-hole defect model." Bone **48**(6): 1388-1400.
- Heino, T. J., T. A. Hentunen and H. K. Vaananen (2002). "Osteocytes inhibit osteoclastic bone resorption through transforming growth factor-beta: enhancement by estrogen." J Cell Biochem **85**(1): 185-197.
- Hengartner, N. E., J. Fiedler, A. Ignatius and R. E. Brenner (2013). "IL-1beta inhibits human osteoblast migration." Mol Med **19**: 36-42.
- Hibi, H., Y. Yamada, M. Ueda and Y. Endo (2006). "Alveolar cleft osteoplasty using tissue-engineered osteogenic material." Int J Oral Maxillofac Surg **35**(6): 551-555.
- Hill, P. A., A. Tumber and M. C. Meikle (1997). "Multiple extracellular signals promote osteoblast survival and apoptosis." Endocrinology **138**(9): 3849-3858.
- Hock, J. M., M. Centrella and E. Canalis (1988). "Insulin-like growth factor I has independent effects on bone matrix formation and cell replication." Endocrinology **122**(1): 254-260.
- Hofmann, I., E. H. Stover, D. E. Cullen, J. Mao, K. J. Morgan, B. H. Lee, M. G. Kharas, P. G. Miller, M. G. Cornejo, R. Okabe, S. A. Armstrong, N. Ghilardi, S. Gould, F. J. de Sauvage, A. P. McMahon and D. G. Gilliland (2009). "Hedgehog signaling is dispensable for adult murine hematopoietic stem cell function and hematopoiesis." Cell Stem Cell **4**(6): 559-567.
- Hohn, D. C., R. D. MacKay, B. Halliday and T. K. Hunt (1976). "Effect of O<sub>2</sub> tension on microbicidal function of leukocytes in wounds and in vitro." Surg Forum **27**(62): 18-20.
- Holmbeck, K., P. Bianco, J. Caterina, S. Yamada, M. Kromer, S. A. Kuznetsov, M. Mankani, P. G. Robey, A. R. Poole, I. Pidoux, J. M. Ward and H. Birkedal-Hansen (1999). "MT1-MMP-deficient mice develop dwarfism, osteopenia, arthritis, and connective tissue disease due to inadequate collagen turnover." Cell **99**(1): 81-92.
- Holstein, J. H., M. D. Menger, C. Scheuer, C. Meier, U. Culemann, R. J. Wirbel, P. Garcia and T. Pohlemann (2007). "Erythropoietin (EPO) — EPO-receptor signaling improves early endochondral ossification and mechanical strength in fracture healing." Life Sciences **80**: 893–900.
- Holstein, J. H., M. Orth, C. Scheuer, A. Tami, S. C. Becker, P. Garcia, T. Histing, P. Mörsdorf, M. Klein, T. Pohlemann and M. D. Menger (2011). "Erythropoietin stimulates bone formation, cell proliferation, and angiogenesis in a femoral segmental defect model in mice." Bone **49**: 1037–1045.
- Holy, X. and E. Zerath (1996). "[The suspension device for hindlimb unloading in the rat-- results of a video monitoring study]." Stal **21**(3-4): 177-184.
- Holy, X. and E. Zerath (2000). "Bone mass increases in less than 4 wk of voluntary exercising in growing rats." Med Sci Sports Exerc **32**(9): 1562-1569.
- Horwood, N. J., J. Elliott, T. J. Martin and M. T. Gillespie (1998). "Osteotropic agents regulate the expression of osteoclast differentiation factor and osteoprotegerin in osteoblastic stromal cells." Endocrinology **139**(11): 4743-4746.

- Hosokawa, K., F. Arai, H. Yoshihara, H. Iwasaki, M. Hembree, T. Yin, Y. Nakamura, Y. Gomei, K. Takubo, H. Shiama, S. Matsuoka, L. Li and T. Suda (2010). "Cadherin-based adhesion is a potential target for niche manipulation to protect hematopoietic stem cells in adult bone marrow." Cell Stem Cell **6**(3): 194-198.
- Huff, J. E., G. E. Kaufman and M. Ingram (1975). "Hematologic changes in mice during and after exposure to severe hypobaric hypoxia." Aviat Space Environ Med **46**(9): 1147-1151.
- Hughes-Fulford, M. and C. F. Li (2011). "The role of FGF-2 and BMP-2 in regulation of gene induction, cell proliferation and mineralization." J Orthop Surg Res **6**: 8.
- Imai, Y., H. Terai, C. Nomura-Furuwatari, S. Mizuno, K. Matsumoto, T. Nakamura and K. Takaoka (2005). "Hepatocyte growth factor contributes to fracture repair by upregulating the expression of BMP receptors." J Bone Miner Res **20**(10): 1723-1730.
- Inaoka, T., G. Bilbe, O. Ishibashi, K. Tezuka, M. Kumegawa and T. Kokubo (1995). "Molecular cloning of human cDNA for cathepsin K: novel cysteine proteinase predominantly expressed in bone." Biochem Biophys Res Commun **206**(1): 89-96.
- Ishimi, Y., C. Miyaura, C. H. Jin, T. Akatsu, E. Abe, Y. Nakamura, A. Yamaguchi, S. Yoshiki, T. Matsuda, T. Hirano and et al. (1990). "IL-6 is produced by osteoblasts and induces bone resorption." J Immunol **145**(10): 3297-3303.
- Ivanovic, Z. (2009). "Hypoxia or in situ normoxia: The stem cell paradigm." J Cell Physiol **219**(2): 271-275.
- Jacobson, L., E. Goldwasser, W. Fried and L. Plzak (1957). "Role of the Kidney in Erythropoiesis." Nature **179**.
- Jansen, J., S. Hanks, J. M. Thompson, M. J. Dugan and L. P. Akard (2005). "Transplantation of hematopoietic stem cells from the peripheral blood." J Cell Mol Med **9**(1): 37-50.
- Jelkmann, W. (2011). "Regulation of erythropoietin production." J Physiol **589**(Pt 6): 1251-1258.
- Jin, D. K., K. Shido, H. G. Kopp, I. Petit, S. V. Shmelkov, L. M. Young, A. T. Hooper, H. Amano, S. T. Avezilla, B. Heissig, K. Hattori, F. Zhang, D. J. Hicklin, Y. Wu, Z. Zhu, A. Dunn, H. Salari, Z. Werb, N. R. Hackett, R. G. Crystal, D. Lyden and S. Rafii (2006). "Cytokine-mediated deployment of SDF-1 induces revascularization through recruitment of CXCR4+ hemangiocytes." Nat Med **12**(5): 557-567.
- Jung, Y., J. Song, Y. Shiozawa, J. Wang, Z. Wang, B. Williams, A. Havens, A. Schneider, C. Ge, R. T. Franceschi, L. K. McCauley, P. H. Krebsbach and R. S. Taichman (2008). "Hematopoietic stem cells regulate mesenchymal stromal cell induction into osteoblasts thereby participating in the formation of the stem cell niche." Stem Cells **26**(8): 2042-2051.
- Jung, Y., J. Wang, J. Song, Y. Shiozawa, A. Havens, Z. Wang, Y. X. Sun, S. G. Emerson, P. H. Krebsbach and R. S. Taichman (2007). "Annexin II expressed by osteoblasts and endothelial cells regulates stem cell adhesion, homing, and engraftment following transplantation." Blood **110**(1): 82-90.
- Kacena, M. A., C. M. Gundberg and M. C. Horowitz (2006). "A reciprocal regulatory interaction between megakaryocytes, bone cells, and hematopoietic stem cells." Bone **39**(5): 978-984.
- Kahn, A. J. and N. C. Partridge (1987). "New concepts in bone remodeling: an expanding role for the osteoblast." Am J Otolaryngol **8**(5): 258-264.

- Kaneki, H., R. Guo, D. Chen, Z. Yao, E. M. Schwarz, Y. E. Zhang, B. F. Boyce and L. Xing (2006). "Tumor necrosis factor promotes Runx2 degradation through up-regulation of Smurf1 and Smurf2 in osteoblasts." *J Biol Chem* **281**(7): 4326-4333.
- Kanichai, M., D. Ferguson, P. J. Prendergast and V. A. Campbell (2008). "Hypoxia promotes chondrogenesis in rat mesenchymal stem cells: a role for AKT and hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha." *J Cell Physiol* **216**(3): 708-715.
- Kaplan, R. N., B. Psaila and D. Lyden (2007). "Niche-to-niche migration of bone-marrow-derived cells." *Trends Mol Med* **13**(2): 72-81.
- Karsdal, M. A., K. Henriksen, M. G. Sorensen, J. Gram, S. Schaller, M. H. Dziegiel, A. M. Heegaard, P. Christophersen, T. J. Martin, C. Christiansen and J. Bollerslev (2005). "Acidification of the osteoclastic resorption compartment provides insight into the coupling of bone formation to bone resorption." *Am J Pathol* **166**(2): 467-476.
- Kasperk, C. H., J. E. Wergedal, J. R. Farley, T. A. Linkhart, R. T. Turner and D. J. Baylink (1989). "Androgens directly stimulate proliferation of bone cells in vitro." *Endocrinology* **124**(3): 1576-1578.
- Kassem, M., J. Rungby, L. Mosekilde and E. F. Eriksen (1992). "Ultrastructure of human osteoblasts and associated matrix in culture." *APMIS* **100**(6): 490-497.
- Katayama, Y., M. Battista, W. M. Kao, A. Hidalgo, A. J. Peired, S. A. Thomas and P. S. Frenette (2006). "Signals from the sympathetic nervous system regulate hematopoietic stem cell egress from bone marrow." *Cell* **124**(2): 407-421.
- Kawaguchi, H., D. Chikazu, K. Nakamura, M. Kumegawa and Y. Hakeda (2000). "Direct and indirect actions of fibroblast growth factor 2 on osteoclastic bone resorption in cultures." *J Bone Miner Res* **15**(3): 466-473.
- Kennedy, O. D., B. C. Herman, D. M. Laudier, R. J. Majeska, H. B. Sun and M. B. Schaffler (2012). "Activation of resorption in fatigue-loaded bone involves both apoptosis and active pro-osteoclastogenic signaling by distinct osteocyte populations." *Bone* **50**(5): 1115-1122.
- Key, J. (1934). "Key JA. The effect of a local calcium depot on osteogenesis and healing of fractures." *J Bone Joint Surg Am* **16**: 176-184.
- Kiel, M. J., O. H. Yilmaz, T. Iwashita, C. Terhorst and S. J. Morrison (2005). "SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells." *Cell* **121**(7): 1109-1121.
- Kirkup, J. (1995). "Perceptions of Amputation before and after Gunpowder." *Vesalius* **1**(2): 51-58.
- Kitaori, T., I. Hiromu, S. M., TsutsumiRyosuke, YoshitomiHiroyuki, O. Shinya, NakanoMasakazu, FujiiNobutaka, NagasawaTakashi and NakamuraTakashi (2009). "Stromal Cell-Derived Factor 1/CXCR4 Signaling Is Critical for the Recruitment of Mesenchymal Stem Cells to the Fracture Site During Skeletal Repair in a Mouse Model." *ARTHRITIS & RHEUMATISM* **60**(No 3): 813-823.
- Kitaori, T., H. Ito, E. M. Schwarz, R. Tsutsumi, H. Yoshitomi, S. Oishi, M. Nakano, N. Fujii, T. Nagasawa and T. Nakamura (2009). "Stromal cell-derived factor 1/CXCR4 signaling is critical for the recruitment of mesenchymal stem cells to the fracture site during skeletal repair in a mouse model." *Arthritis Rheum* **60**(3): 813-823.
- Kitaura, H., P. Zhou, H. J. Kim, D. V. Novack, F. P. Ross and S. L. Teitelbaum (2005). "M-CSF mediates TNF-induced inflammatory osteolysis." *J Clin Invest* **115**(12): 3418-3427.
- Kivirikko, K. I. and D. J. Prockop (1967). "Enzymatic hydroxylation of proline and lysine in protocollagen." *Proc Natl Acad Sci U S A* **57**(3): 782-789.

- Klein, S., F. G. Giancotti, M. Presta, S. M. Albelda, C. A. Buck and D. B. Rifkin (1993). "Basic fibroblast growth factor modulates integrin expression in microvascular endothelial cells." Mol Biol Cell **4**(10): 973-982.
- Knott, L. and A. J. Bailey (1998). "Collagen cross-links in mineralizing tissues: a review of their chemistry, function, and clinical relevance." Bone **22**(3): 181-187.
- Kobayashi, Y., I. Take, T. Yamashita, T. Mizoguchi, T. Ninomiya, T. Hattori, S. Kurihara, H. Ozawa, N. Udagawa and N. Takahashi (2005). "Prostaglandin E2 receptors EP2 and EP4 are down-regulated during differentiation of mouse osteoclasts from their precursors." J Biol Chem **280**(25): 24035-24042.
- Kojima, H., T. Uede and T. Uemura (2004). "In vitro and in vivo effects of the overexpression of osteopontin on osteoblast differentiation using a recombinant adenoviral vector." J Biochem **136**(3): 377-386.
- Kollet, O., A. Dar, S. Shvitiel, A. Kalinkovich, K. Lapid, Y. Sztainberg, M. Tesio, R. M. Samstein, P. Goichberg, A. Spiegel, A. Elson and T. Lapidot (2006). "Osteoclasts degrade endosteal components and promote mobilization of hematopoietic progenitor cells." Nat Med **12**(6): 657-664.
- Komatsu, D. E., M. N. Mary, R. J. Schroeder, A. G. Robling, C. H. Turner and S. J. Warden (2010). "Modulation of Wnt signaling influences fracture repair." J Orthop Res **28**(7): 928-936.
- Komori, T. (2010). "Regulation of osteoblast differentiation by Runx2." Adv Exp Med Biol **658**: 43-49.
- Kopp, H. G., S. T. Avezilla, A. T. Hooper and S. Rafii (2005). "The bone marrow vascular niche: home of HSC differentiation and mobilization." Physiology (Bethesda) **20**: 349-356.
- Krause, D. S., D. T. Scadden and F. I. Preffer (2013). "The hematopoietic stem cell niche-- home for friend and foe?" Cytometry B Clin Cytom **84**(1): 7-20.
- Krohn, K. A., J. M. Link and R. P. Mason (2008). "Molecular imaging of hypoxia." J Nucl Med **49 Suppl 2**: 129S-148S.
- Kruyt, M. C., W. J. Dhert, H. Yuan, C. E. Wilson, C. A. van Blitterswijk, A. J. Verbout and J. D. de Bruijn (2004). "Bone tissue engineering in a critical size defect compared to ectopic implantations in the goat." J Orthop Res **22**(3): 544-551.
- Kubota, K., C. Sakikawa, M. Katsumata, T. Nakamura and K. Wakabayashi (2002). "Platelet-derived growth factor BB secreted from osteoclasts acts as an osteoblastogenesis inhibitory factor." J Bone Miner Res **17**(2): 257-265.
- Kubota, Y., K. Takubo and T. Suda (2008). "Bone marrow long label-retaining cells reside in the sinusoidal hypoxic niche." Biochem Biophys Res Commun **366**(2): 335-339.
- Kukita, T., H. Nomiya, Y. Ohmoto, A. Kukita, T. Shuto, T. Hotokebuchi, Y. Sugioka, R. Miura and T. Iijima (1997). "Macrophage inflammatory protein-1 alpha (LD78) expressed in human bone marrow: its role in regulation of hematopoiesis and osteoclast recruitment." Lab Invest **76**(3): 399-406.
- Kular, J., J. Tickner, S. M. Chim and J. Xu (2012). "An overview of the regulation of bone remodelling at the cellular level." Clinical Biochemistry **45**: 863-873.
- Kumagai, K., A. Vasanji, J. A. Drazba, R. S. Butler and G. F. Muschler (2008). "Circulating cells with osteogenic potential are physiologically mobilized into the fracture healing site in the parabiotic mice model." J Orthop Res **26**(2): 165-175.
- Kumar, S. and S. Ponnazhagan (2012). "Mobilization of bone marrow mesenchymal stem cells in vivo augments bone healing in a mouse model of segmental bone defect." Bone **50**(4): 1012-1018.



- Kuznetsov, S. A., M. H. Mankani, S. Gronthos, K. Satomura, P. Bianco and P. G. Robey (2001). "Circulating skeletal stem cells." J Cell Biol **153**(5): 1133-1140.
- Lam, J., S. Takeshita, J. E. Barker, O. Kanagawa, F. P. Ross and S. L. Teitelbaum (2000). "TNF-alpha induces osteoclastogenesis by direct stimulation of macrophages exposed to permissive levels of RANK ligand." J Clin Invest **106**(12): 1481-1488.
- Lang, T., A. LeBlanc, H. Evans, Y. Lu, H. Genant and A. Yu (2004). "Cortical and trabecular bone mineral loss from the spine and hip in long-duration spaceflight." J Bone Miner Res **19**(6): 1006-1012.
- Lange, Gibson, Driscoll, Servona, Mishurova, Vacek, Ichiki and Khrushchov (1994). Hematology studies in rats flown on the soviet biosatellite Cosmos 2044. . F. R. o. t. U. S. E. F. o. t. S. B. C. 2044. NASA TM 108802, NASA Ames Research Center, Moffett Field, Connolly, J.P., Grindeland, R.E., Ballard, R.W. (eds.). **Volume I: Experiments K-7-01-K-7-15, pp. 491-510.**
- Lataillade, J. J., P. Brunet de la Grange, G. Uzan and M. C. Le Bousse-Kerdiles (2010). "[Are stem cells as old as their niches? The quest for eternal life...]." Med Sci (Paris) **26**(6-7): 582-585.
- Lataillade, J. J., D. Clay, P. Bourin, F. Herodin, C. Dupuy, C. Jasmin and M. C. Le Bousse-Kerdiles (2002). "Stromal cell-derived factor 1 regulates primitive hematopoiesis by suppressing apoptosis and by promoting G(0)/G(1) transition in CD34(+) cells: evidence for an autocrine/paracrine mechanism." Blood **99**(4): 1117-1129.
- Lataillade, J. J., D. Clay, C. Dupuy, S. Rigal, C. Jasmin, P. Bourin and M. C. Le Bousse-Kerdiles (2000). "Chemokine SDF-1 enhances circulating CD34(+) cell proliferation in synergy with cytokines: possible role in progenitor survival." Blood **95**(3): 756-768.
- Lazarus, H. M., S. E. Haynesworth, S. L. Gerson and A. I. Caplan (1997). "Human bone marrow-derived mesenchymal (stromal) progenitor cells (MPCs) cannot be recovered from peripheral blood progenitor cell collections." J Hematother **6**(5): 447-455.
- Le Blanc, K. and D. Mougiakakos (2012). "Multipotent mesenchymal stromal cells and the innate immune system." Nat Rev Immunol **12**(5): 383-396.
- Leaffer, D., M. Sweeney, L. A. Kellerman, Z. Avnur, J. L. Krstenansky, B. H. Vickery and J. P. Caulfield (1995). "Modulation of osteogenic cell ultrastructure by RS-23581, an analog of human parathyroid hormone (PTH)-related peptide-(1-34), and bovine PTH-(1-34)." Endocrinology **136**(8): 3624-3631.
- LeBlanc, A., V. Schneider, L. Shackelford, S. West, V. Oganov, A. Bakulin and L. Voronin (2000). "Bone mineral and lean tissue loss after long duration space flight." J Musculoskelet Neuronal Interact **1**(2): 157-160.
- Leblanc, A. D., V. S. Schneider, H. J. Evans, D. A. Engelbretson and J. M. Krebs (1990). "Bone mineral loss and recovery after 17 weeks of bed rest." J Bone Miner Res **5**(8): 843-850.
- Lee, J., A. Stavropoulos, C. Susin and U. M. Wikesjo (2010). "Periodontal regeneration: focus on growth and differentiation factors." Dent Clin North Am **54**(1): 93-111.
- Lee, M. H., T. G. Kwon, H. S. Park, J. M. Wozney and H. M. Ryoo (2003). "BMP-2-induced Osterix expression is mediated by Dlx5 but is independent of Runx2." Biochem Biophys Res Commun **309**(3): 689-694.
- Li, P., J. Huang, H.-j. Tian, Q.-y. Huang, C.-h. Jiang and Y.-q. Gao (2011). "Regulation of bone marrow hematopoietic stem cell is involved in high-altitude erythrocytosis." (39): 37-46.

- Li, P., J. Huang, H. J. Tian, Q. Y. Huang, C. H. Jiang and Y. Q. Gao (2011). "Regulation of bone marrow hematopoietic stem cell is involved in high-altitude erythrocytosis." Exp Hematol **39**(1): 37-46.
- Li, S. D., Q. L. Zhai and L. G. Qiu (2011). "Imbalance between bone formation and resorption in hematopoietic stem/progenitor cells mobilization." Transplant Proc **43**(10): 3920-3926.
- Li, W., S. A. Johnson, W. C. Shelley and M. C. Yoder (2004). "Hematopoietic stem cell repopulating ability can be maintained in vitro by some primary endothelial cells." Exp Hematol **32**(12): 1226-1237.
- Li, W. M., W. Q. Huang, Y. H. Huang, D. Z. Jiang and Q. R. Wang (2000). "Positive and negative hematopoietic cytokines produced by bone marrow endothelial cells." Cytokine **12**(7): 1017-1023.
- Li, X., L. Qin, M. Bergenstock, L. M. Bevelock, D. V. Novack and N. C. Partridge (2007). "Parathyroid hormone stimulates osteoblastic expression of MCP-1 to recruit and increase the fusion of pre/osteoclasts." J Biol Chem **282**(45): 33098-33106.
- Li, X., Y. Zhang, H. Kang, W. Liu, P. Liu, J. Zhang, S. E. Harris and D. Wu (2005). "Sclerostin binds to LRP5/6 and antagonizes canonical Wnt signaling." J Biol Chem **280**(20): 19883-19887.
- Lian, J. B. and G. S. Stein (1995). "Development of the osteoblast phenotype: molecular mechanisms mediating osteoblast growth and differentiation." Iowa Orthop J **15**: 118-140.
- Lin, C., X. Jiang, Z. Dai, X. Guo, T. Weng, J. Wang, Y. Li, G. Feng, X. Gao and L. He (2009). "Sclerostin mediates bone response to mechanical unloading through antagonizing Wnt/beta-catenin signaling." J Bone Miner Res **24**(10): 1651-1661.
- Lind, M., B. Schumacker, K. Soballe, J. Keller, F. Melsen and C. Bunger (1993). "Transforming growth factor-beta enhances fracture healing in rabbit tibiae." Acta Orthop Scand **64**(5): 553-556.
- Lips, P., P. Courpron and P. J. Meunier (1978). "Mean wall thickness of trabecular bone packets in the human iliac crest: changes with age." Calcif Tissue Res **26**(1): 13-17.
- Little, D. G., M. Ramachandran and A. Schindeler (2007). "The anabolic and catabolic responses in bone repair." J Bone Joint Surg Br **89**(4): 425-433.
- Liu, L., Q. Yu, J. Lin, X. Lai, W. Cao, K. Du, Y. Wang, K. Wu, Y. Hu, L. Zhang, H. Xiao, Y. Duan and H. Huang (2011). "Hypoxia-inducible Factor-1alpha is essential for Hypoxia-induced MSC mobilization into the peripheral blood." Stem Cells and development **20**(11): 1961-1971.
- Long, F. (2012). "Building strong bones: molecular regulation of the osteoblast lineage." Nat Rev Mol Cell Biol **13**(1): 27-38.
- Long, M. W., J. A. Robinson, E. A. Ashcraft and K. G. Mann (1995). "Regulation of human bone marrow-derived osteoprogenitor cells by osteogenic growth factors." J Clin Invest **95**(2): 881-887.
- Lord, B. I. and M. J. Murphy, Jr. (1973). "Hematopoietic stem cell regulation. II. Chronic effects of hypoxic-hypoxia on CFU kinetics." Blood **42**(1): 89-98.
- Lu, C., N. Saless, X. Wang, A. Sinha, S. Decker, G. Kazakia, H. Hou, B. Williams, H. M. Swartz, T. K. Hunt, T. Miclau and R. S. Marcucio (2013). "The role of oxygen during fracture healing." Bone **52**(1): 220-229.

- Luo, G., P. Ducy, M. D. McKee, G. J. Pinero, E. Loyer, R. R. Behringer and G. Karsenty (1997). "Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein." *Nature* **386**(6620): 78-81.
- Lymperi, S., N. Horwood, S. Marley, M. Y. Gordon, A. P. Cope and F. Dazzi (2008). "Strontium can increase some osteoblasts without increasing hematopoietic stem cells." *Blood* **111**(3): 1173-1181.
- Ma, T., W. L. Grayson, M. Frohlich and G. Vunjak-Novakovic (2009). "Hypoxia and stem cell-based engineering of mesenchymal tissues." *Biotechnol Prog* **25**(1): 32-42.
- Ma, Y. L., R. L. Cain, D. L. Halladay, X. Yang, Q. Zeng, R. R. Miles, S. Chandrasekhar, T. J. Martin and J. E. Onyia (2001). "Catabolic effects of continuous human PTH (1--38) in vivo is associated with sustained stimulation of RANKL and inhibition of osteoprotegerin and gene-associated bone formation." *Endocrinology* **142**(9): 4047-4054.
- Macé, Y. (2007). *Processus de réparation osseuse : conséquences sur le délai de mise en contrainte. M. M. P. e. d. R. e. p. m. e. c. d. l. a. locomoteur.*
- Machwate, M., E. Zerath, X. Holy, P. Pastoureau and P. J. Marie (1994). "Insulin-like growth factor-I increases trabecular bone formation and osteoblastic cell proliferation in unloaded rats." *Endocrinology* **134**(3): 1031-1038.
- Mack, P. B., P. A. LaChance, G. P. Vose and F. B. Vogt (1967). "Bone demineralization of foot and hand of gemini-titan IV, V and VII astronauts during orbital flight." *Am J Roentgenol Radium Ther Nucl Med* **100**(3): 503-511.
- Mackie, E. J., Y. A. Ahmed, L. Tatarczuch, K. S. Chen and M. Mirams (2008). "Endochondral ossification: how cartilage is converted into bone in the developing skeleton." *Int J Biochem Cell Biol* **40**(1): 46-62.
- Maes, C., G. Carmeliet and E. Schipani (2012). "Hypoxia-driven pathways in bone development, regeneration and disease." *Nat Rev Rheumatol* **8**(6): 358-366.
- Makley, J. T., K. G. Heiple, S. W. Chase and C. H. Herndon (1967). "The effect of reduced barometric pressure on fracture healing in rats." *J Bone Joint Surg Am* **49**(5): 903-914.
- Malhotra, S. and P. W. Kincade (2009). "Wnt-related molecules and signaling pathway equilibrium in hematopoiesis." *Cell Stem Cell* **4**(1): 27-36.
- Malone, J. D., S. L. Teitelbaum, G. L. Griffin, R. M. Senior and A. J. Kahn (1982). "Recruitment of osteoclast precursors by purified bone matrix constituents." *J Cell Biol* **92**(1): 227-230.
- Mankani, M. H., S. A. Kuznetsov, B. Shannon, R. K. Nalla, R. O. Ritchie, Y. Qin and P. G. Robey (2006). "Canine cranial reconstruction using autologous bone marrow stromal cells." *Am J Pathol* **168**(2): 542-550.
- Manring, M. M., A. Hawk, J. H. Calhoun and R. C. Andersen (2009). "Treatment of war wounds: a historical review." *Clin Orthop Relat Res* **467**(8): 2168-2191.
- Marie, P. J. (2003). "Fibroblast growth factor signaling controlling osteoblast differentiation." *Gene* **316**: 23-32.
- Markmann, A., H. Hausser, E. Schonherr and H. Kresse (2000). "Influence of decorin expression on transforming growth factor-beta-mediated collagen gel retraction and biglycan induction." *Matrix Biol* **19**(7): 631-636.
- Martin, T. J. (2005). "Osteoblast-derived PTHrP is a physiological regulator of bone formation." *J Clin Invest* **115**(9): 2322-2324.
- Martin, T. J. and N. A. Sims (2005). "Osteoclast-derived activity in the coupling of bone formation to resorption." *Trends Mol Med* **11**(2): 76-81.

- Matsumoto, T., K. Atsuhiko, KurodaRyosuke, IshikawaMasakazu, MifuneYutaka, IwasakiHiroto, MiwaMasahiko, HoriiMiki, HayashiSaeko, OyamadaAkira, N. Hiromi, MurasawaSatoshi, DoitaMinoru, KurosakaMasahiro and AsaharaTakayuki (2006). "Therapeutic Potential of Vasculogenesis and Osteogenesis Promoted by Peripheral Blood CD34-Positive Cells for Functional Bone Healing." The American Journal of Pathology **169**(4): 1440-1457.
- Matsumoto, T., D. Goto and S. Sato (2013). "Subtraction micro-computed tomography of angiogenesis and osteogenesis during bone repair using synchrotron radiation with a novel contrast agent." Lab Invest **93**(9): 1054-1063.
- Matsuo, K. and N. Irie (2008). "Osteoclast–osteoblast communication." Archives of Biochemistry and Biophysics **473**: 201-209.
- McHugh, K. P., K. Hodivala-Dilke, M. H. Zheng, N. Namba, J. Lam, D. Novack, X. Feng, F. P. Ross, R. O. Hynes and S. L. Teitelbaum (2000). "Mice lacking beta3 integrins are osteosclerotic because of dysfunctional osteoclasts." J Clin Invest **105**(4): 433-440.
- Mendez-Ferrer, S., D. Lucas, M. Battista and P. S. Frenette (2008). "Haematopoietic stem cell release is regulated by circadian oscillations." Nature **452**(7186): 442-447.
- Mendez-Ferrer, S., T. V. Michurina, F. Ferraro, A. R. Mazloom, B. D. Macarthur, S. A. Lira, D. T. Scadden, A. Ma'ayan, G. N. Enikolopov and P. S. Frenette (2010). "Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche." Nature **466**(7308): 829-834.
- Metz, S. (2003). "La guerre asymétrique et l'avenir de l'Occident." Politique étrangère: 25-40.
- Mignon, A. (1927). Le Service de Santé pendant la guerre 1914-1918. Paris.
- Miharada, K., G. Karlsson, M. Rehn, E. Rorby, K. Siva, J. Cammenga and S. Karlsson (2011). "Cripto regulates hematopoietic stem cells as a hypoxic-niche-related factor through cell surface receptor GRP78." Cell Stem Cell **9**(4): 330-344.
- Miller, C. L. and C. J. Eaves (2002). "Long-term culture-initiating cell assays for human and murine cells." Methods Mol Med **63**: 123-141.
- Miller, F. D. and D. R. Kaplan (2012). "Mobilizing endogenous stem cells for repair and regeneration: are we there yet?" Cell Stem Cell **10**(6): 650-652.
- Miller, S. C., L. de Saint-Georges, B. M. Bowman and W. S. Jee (1989). "Bone lining cells: structure and function." Scanning Microsc **3**(3): 953-960; discussion 960-951.
- Moester, M. J., S. E. Papapoulos, C. W. Lowik and R. L. van Bezooijen (2010). "Sclerostin: current knowledge and future perspectives." Calcif Tissue Int **87**(2): 99-107.
- Morey-Holton, E., R. K. Globus, A. Kaplansky and G. Durnova (2005). "The hindlimb unloading rat model: literature overview, technique update and comparison with space flight data." Adv Space Biol Med **10**: 7-40.
- Morey, E. R. and D. J. Baylink (1978). "Inhibition of bone formation during space flight." Science **201**(4361): 1138-1141.
- Morey, E. R., E. E. Sabelman, R. T. Turner and D. J. Baylink (1979). "A new rat model simulating some aspects of space flight." Physiologist **22**(6): S23-24.
- Morgan, J. and R. Leighton (1995). Radiographic appearance of fracture healing. radiology of small animal fracture management. M. Leighton. Philadelphia, WB Saunders: 34-43.
- Morvan, F., K. Boulukos, P. Clement-Lacroix, S. Roman Roman, I. Suc-Royer, B. Vayssiere, P. Ammann, P. Martin, S. Pinho, P. Pognonec, P. Mollat, C. Niehrs, R. Baron and G. Rawadi (2006). "Deletion of a single allele of the Dkk1 gene leads to an increase in bone formation and bone mass." J Bone Miner Res **21**(6): 934-945.

- Mountziaris, P. M. and A. G. Mikos (2008). "Modulation of the inflammatory response for enhanced bone tissue regeneration." Tissue Eng Part B Rev **14**(2): 179-186.
- Mullender, M. G., R. Huiskes, H. Versleyen and P. Buma (1996). "Osteocyte density and histomorphometric parameters in cancellous bone of the proximal femur in five mammalian species." J Orthop Res **14**(6): 972-979.
- Mundy, G., R. Garrett, S. Harris, J. Chan, D. Chen, G. Rossini, B. Boyce, M. Zhao and G. Gutierrez (1999). "Stimulation of bone formation in vitro and in rodents by statins." Science **286**(5446): 1946-1949.
- Nagata, T., C. G. Bellows, S. Kasugai, W. T. Butler and J. Sodek (1991). "Biosynthesis of bone proteins [SPP-1 (secreted phosphoprotein-1, osteopontin), BSP (bone sialoprotein) and SPARC (osteonectin)] in association with mineralized-tissue formation by fetal-rat calvarial cells in culture." Biochem J **274** ( Pt 2): 513-520.
- Nakagawa, N., H. Yasuda, K. Yano, S. Mochizuki, N. Kobayashi, H. Fujimoto, N. Shima, T. Morinaga, D. Chikazu, H. Kawaguchi and K. Higashio (1999). "Basic fibroblast growth factor induces osteoclast formation by reciprocally regulating the production of osteoclast differentiation factor and osteoclastogenesis inhibitory factor in mouse osteoblastic cells." Biochem Biophys Res Commun **265**(1): 158-163.
- Nakamura, A., C. Ly, M. Cipetic, N. A. Sims, J. Vieusseux, V. Kartsogiannis, S. Bouralexis, H. Saleh, H. Zhou, J. T. Price, T. J. Martin, K. W. Ng, M. T. Gillespie and J. M. Quinn (2007). "Osteoclast inhibitory lectin (OCIL) inhibits osteoblast differentiation and function in vitro." Bone **40**(2): 305-315.
- Nakamura, T., T. Aikawa, M. Iwamoto-Enomoto, M. Iwamoto, Y. Higuchi, M. Pacifici, N. Kinto, A. Yamaguchi, S. Noji, K. Kurisu and T. Matsuya (1997). "Induction of osteogenic differentiation by hedgehog proteins." Biochem Biophys Res Commun **237**(2): 465-469.
- Nakamura, Y., F. Arai, H. Iwasaki, K. Hosokawa, I. Kobayashi, Y. Gomei, Y. Matsumoto, H. Yoshihara and T. Suda (2010). "Isolation and characterization of endosteal niche cell populations that regulate hematopoietic stem cells." Blood **116**(9): 1422-1432.
- Nakashima, K., X. Zhou, G. Kunkel, Z. Zhang, J. M. Deng, R. R. Behringer and B. de Crombrughe (2002). "The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation." Cell **108**(1): 17-29.
- Nakashima, T., M. Hayashi, T. Fukunaga, K. Kurata, M. Oh-Hora, J. Q. Feng, L. F. Bonewald, T. Kodama, A. Wutz, E. F. Wagner, J. M. Penninger and H. Takayanagi (2011). "Evidence for osteocyte regulation of bone homeostasis through RANKL expression." Nat Med **17**(10): 1231-1234.
- Naveiras, O., V. Nardi, P. L. Wenzel, P. V. Hauschka, F. Fahey and G. Q. Daley (2009). "Bone-marrow adipocytes as negative regulators of the haematopoietic microenvironment." Nature **460**(7252): 259-263.
- Neve, A., A. Corrado and F. P. Cantatore (2011). "Osteoblast physiology in normal and pathological conditions." Cell Tissue Res **343**(2): 289-302.
- Neve, A., A. Corrado and F. P. Cantatore (2013). "Osteocalcin: skeletal and extra-skeletal effects." J Cell Physiol **228**(6): 1149-1153.
- Newby, A. C. (2008). "Metalloproteinase expression in monocytes and macrophages and its relationship to atherosclerotic plaque instability." Arterioscler Thromb Vasc Biol **28**(12): 2108-2114.
- Nielsen, H. M., T. T. Andreassen, T. Ledet and H. Oxlund (1994). "Local injection of TGF-beta increases the strength of tibial fractures in the rat." Acta Orthop Scand **65**(1): 37-41.

- O'Brien, C. A., T. Nakashima and H. Takayanagi (2012). "Osteocyte control of osteoclastogenesis." Bone **xxx**(xxxx).
- O'Brien, H. A. and M. A. Horton (1984). "A short-term assay of myeloid precursor cells in man." Exp Hematol **12**(7): 575-580.
- O'Sullivan, S., D. Naot, K. Callon, F. Porteous, A. Horne, D. Wattie, M. Watson, J. Cornish, P. Browett and A. Grey (2007). "Imatinib promotes osteoblast differentiation by inhibiting PDGFR signaling and inhibits osteoclastogenesis by both direct and stromal cell-dependent mechanisms." J Bone Miner Res **22**(11): 1679-1689.
- Ogata, N., D. Chikazu, N. Kubota, Y. Terauchi, K. Tobe, Y. Azuma, T. Ohta, T. Kadowaki, K. Nakamura and H. Kawaguchi (2000). "Insulin receptor substrate-1 in osteoblast is indispensable for maintaining bone turnover." J Clin Invest **105**(7): 935-943.
- Oh, I. H. and K. R. Kwon (2010). "Concise review: multiple niches for hematopoietic stem cell regulations." Stem Cells **28**(7): 1243-1249.
- Ojeda-Urbe, M., A. Brunot, A. Lenat and M. Legros (1993). "Failure to detect spindle-shaped fibroblastoid cell progenitors in PBPC collections." Acta Haematol **90**(3): 139-143.
- Okamoto, Y., D. Kim, R. Battaglino, H. Sasaki, U. Spate and P. Stashenko (2004). "MIP-1 gamma promotes receptor-activator-of-NF-kappa-B-ligand-induced osteoclast formation and survival." J Immunol **173**(3): 2084-2090.
- Ollier, L. (1872). Traité expérimental et clinique de la régénération des os et de la production artificielle du tissu osseux. Lyon.
- Omatsu, Y., T. Sugiyama, H. Kohara, G. Kondoh, N. Fujii, K. Kohno and T. Nagasawa (2010). "The essential functions of adipo-osteogenic progenitors as the hematopoietic stem and progenitor cell niche." Immunity **33**(3): 387-399.
- Opal, S., L. Thijs, J. M. Cavaillon, J. Cohen and F. Fourrier (2000). "Roundtable I: relationships between coagulation and inflammatory processes." Crit Care Med **28**(9 Suppl): S81-82.
- Osada, H. (1991). "The effects of hypobaric hypoxia on blood components in guinea-pigs." Acta Physiologica Scandinavica **142**: 261-266.
- Otsuru, S., K. Tamai, T. Yamazaki, H. Yoshikawa and Y. Kaneda (2007). "Bone marrow-derived osteoblast progenitor cells in circulating blood contribute to ectopic bone formation in mice." Biochemical and Biophysical Research Communications **354**: 453-458.
- Otsuru, S., K. Tamai, T. Yamazaki, H. Yoshikawa and Y. Kaneda (2008). "Circulating Bone Marrow-Derived Osteoblast Progenitor Cells Are Recruited to the Bone-Forming Site by the CXCR4/Stromal Cell-Derived Factor-1 Pathway." STEM CELLS **26**: 223-234.
- Owen, M. and S. Macpherson (1963). "Cell Population Kinetics of an Osteogenic Tissue. II." J Cell Biol **19**: 33-44.
- Owen, T. A., M. Aronow, V. Shalhoub, L. M. Barone, L. Wilming, M. S. Tassinari, M. B. Kennedy, S. Pockwinse, J. B. Lian and G. S. Stein (1990). "Progressive development of the rat osteoblast phenotype in vitro: reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix." J Cell Physiol **143**(3): 420-430.
- Ozcvici, E., Y. K. Luu, B. Adler, Y. X. Qin, J. Rubin, S. Judex and C. T. Rubin (2010). "Mechanical signals as anabolic agents in bone." Nat Rev Rheumatol **6**(1): 50-59.
- Parfitt, A. M. (2001). "The Bone Remodeling Compartment: A Circulatory Function for Bone Lining Cells." Journal of Bone and Mineral Research **16**(9): 1583-1585.
- Park, D., J. A. Spencer, B. I. Koh, T. Kobayashi, J. Fujisaki, T. L. Clemens, C. P. Lin, H. M. Kronenberg and D. T. Scadden (2012). "Endogenous bone marrow MSCs are dynamic,

- fate-restricted participants in bone maintenance and regeneration." Cell Stem Cell **10**(3): 259-272.
- Parmar, K., P. Mauch, J. A. Vergilio, R. Sackstein and J. D. Down (2007). "Distribution of hematopoietic stem cells in the bone marrow according to regional hypoxia." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(13): 5431-5436.
- Petit, I., M. Szyper-Kravitz, A. Nagler, M. Lahav, A. Peled, L. Habler, T. Ponomaryov, R. S. Taichman, F. Arenzana-Seisdedos, N. Fujii, J. Sandbank, D. Zipori and T. Lapidot (2002). "G-CSF induces stem cell mobilization by decreasing bone marrow SDF-1 and up-regulating CXCR4." Nat Immunol **3**(7): 687-694.
- Pettit, A. R., M. K. Chang, A. Hume and L.-J. Raggatt (2008). "Osteal macrophages: A new twist on coupling during bone dynamics." Bone **43**: 976–982.
- Pfeilschifter, J., S. M. D'Souza and G. R. Mundy (1987). "Effects of transforming growth factor-beta on osteoblastic osteosarcoma cells." Endocrinology **121**(1): 212-218.
- Phillips, A. M. (2005). "Overview of the fracture healing cascade." Injury **36 Suppl 3**: S5-7.
- Pignolo, R. J. and M. Kassem (2011). "Circulating osteogenic cells: implications for injury, repair, and regeneration." J Bone Miner Res **26**(8): 1685-1693.
- Pignolo, R. J. and M. Kassem (2011). "Circulating Osteogenic Cells: Implications for Injury, Repair, and Regeneration." Journal of Bone and Mineral Research **26**(8): 1685–1693.
- Pitchford, S. C., R. C. Furze, C. P. Jones, A. M. Wengner and S. M. Rankin (2009). "Differential mobilization of subsets of progenitor cells from the bone marrow." Cell Stem Cell **4**(1): 62-72.
- Powell, W. F., Jr., K. J. Barry, I. Tulum, T. Kobayashi, S. E. Harris, F. R. Bringhurst and P. D. Pajevic (2011). "Targeted ablation of the PTH/PTHrP receptor in osteocytes impairs bone structure and homeostatic calcemic responses." J Endocrinol **209**(1): 21-32.
- Price, P. A., M. R. Urist and Y. Otawara (1983). "Matrix Gla protein, a new gamma-carboxyglutamic acid-containing protein which is associated with the organic matrix of bone." Biochem Biophys Res Commun **117**(3): 765-771.
- Ragab, A. A., J. L. Nalepka, Y. Bi and E. M. Greenfield (2002). "Cytokines synergistically induce osteoclast differentiation: support by immortalized or normal calvarial cells." Am J Physiol Cell Physiol **283**(3): C679-687.
- Raheja, L. F., D. C. Genetos, A. Wong and C. E. Yellowley (2011). "Hypoxic regulation of mesenchymal stem cell migration: the role of RhoA and HIF-1alpha." Cell Biol Int **35**(10): 981-989.
- Rahn, B. (2002). Bone healing : histologic and physiologic concepts. Bone in clinical orthopaedics. F. GE. Stuttgart New York, Thieme: 287-326.
- Rankin, E. B., C. Wu, R. Khatri, T. L. S. Wilson, R. Andersen, E. Araldi, A. L. Rankin, J. Yuan, C. J. Kuo, E. Schipani and A. J. Giaccia (2012). "The HIF Signaling Pathway in Osteoblasts Directly Modulates Erythropoiesis through the Production of EPO." Cell **149**(March): 63-74,.
- Rao, R. R. and J. P. Stegemann (2013). "Cell-based approaches to the engineering of vascularized bone tissue." Cytotherapy **15**(11): 1309-1322.
- Ravesloot, J. H., T. Eisen, R. Baron and W. F. Boron (1995). "Role of Na-H exchangers and vacuolar H+ pumps in intracellular pH regulation in neonatal rat osteoclasts." J Gen Physiol **105**(2): 177-208.
- Rehn, M., A. Olsson, K. Reckzeh, E. Diffner, P. Carmeliet, G. Landberg and J. Cammenga (2011). "Hypoxic induction of vascular endothelial growth factor regulates murine

- hematopoietic stem cell function in the low-oxygenic niche." *Blood* **118**(6): 1534-1543.
- Reponen, P., C. Sahlberg, C. Munaut, I. Thesleff and K. Tryggvason (1994). "High expression of 92-kDa type IV collagenase (gelatinase) in the osteoclast lineage during mouse development." *Ann N Y Acad Sci* **732**: 472-475.
- Richmond, T. D., M. Chohan and D. L. Barber (2005). "Turning cells red: signal transduction mediated by erythropoietin." *Trends Cell Biol* **15**(3): 146-155.
- Rizo, A., E. Vellenga, G. de Haan and J. J. Schuringa (2006). "Signaling pathways in self-renewing hematopoietic and leukemic stem cells: do all stem cells need a niche?" *Hum Mol Genet* **15 Spec No 2**: R210-219.
- Robling, A. G., A. B. Castillo and C. H. Turner (2006). "Biomechanical and molecular regulation of bone remodeling." *Annu Rev Biomed Eng* **8**: 455-498.
- Robling, A. G., P. J. Niziolek, L. A. Baldridge, K. W. Condon, M. R. Allen, I. Alam, S. M. Mantila, J. Gluhak-Heinrich, T. M. Bellido, S. E. Harris and C. H. Turner (2008). "Mechanical stimulation of bone in vivo reduces osteocyte expression of Sost/sclerostin." *J Biol Chem* **283**(9): 5866-5875.
- Rochefort, G. Y., D. Bruno, L. Adriana, H. tOlivier, B. Pierre, C. Pierre, E. Véronique and D. Jorge (2006). "Multipotential Mesenchymal Stem Cells Are Mobilized into Peripheral Blood by Hypoxia." *STEM CELLS*(24): 2202-2208.
- Rochefort, G. Y., B. Delorme, A. Lopez, O. Herault, P. Bonnet, P. Charbord, V. Eder and J. Domenech (2006). "Multipotential mesenchymal stem cells are mobilized into peripheral blood by hypoxia." *Stem Cells* **24**(10): 2202-2208.
- Rochefort, G. Y., S. Pallu and C. L. Benhamou (2010). "Osteocyte: the unrecognized side of bone tissue." *Osteoporos Int* **21**: 1457-1469.
- Rodriguez, P. G., F. N. Felix, D. T. Woodley and E. K. Shim (2008). "The role of oxygen in wound healing: a review of the literature." *Dermatol Surg* **34**(9): 1159-1169.
- Rosova, I., M. Dao, B. Capoccia, D. Link and J. A. Nolte (2008). "Hypoxic preconditioning results in increased motility and improved therapeutic potential of human mesenchymal stem cells." *Stem Cells* **26**(8): 2173-2182.
- Ross, E. A., S. Freeman, Y. Zhao, T. S. Dhanjal, E. J. Ross, S. Lax, Z. Ahmed, T. Z. Hou, N. Kalia, S. Egginton, G. Nash, S. P. Watson, J. Frampton and C. D. Buckley (2008). "A novel role for PECAM-1 (CD31) in regulating haematopoietic progenitor cell compartmentalization between the peripheral blood and bone marrow." *PLoS One* **3**(6): e2338.
- Rubin, C., A. S. Turner, S. Bain, C. Mallinckrodt and K. McLeod (2001). "Anabolism. Low mechanical signals strengthen long bones." *Nature* **412**(6847): 603-604.
- Ryu, J., H. J. Kim, E. J. Chang, H. Huang, Y. Banno and H. H. Kim (2006). "Sphingosine 1-phosphate as a regulator of osteoclast differentiation and osteoclast-osteoblast coupling." *EMBO J* **25**(24): 5840-5851.
- Saadeh, P. B., B. J. Mehrara, D. S. Steinbrech, M. E. Dudziak, J. A. Greenwald, J. S. Luchs, J. A. Spector, H. Ueno, G. K. Gittes and M. T. Longaker (1999). "Transforming growth factor-beta1 modulates the expression of vascular endothelial growth factor by osteoblasts." *Am J Physiol* **277**(4 Pt 1): C628-637.
- Saadeh, P. B., B. J. Mehrara, D. S. Steinbrech, J. A. Spector, J. A. Greenwald, G. S. Chin, H. Ueno, G. K. Gittes and M. T. Longaker (2000). "Mechanisms of fibroblast growth factor-2 modulation of vascular endothelial growth factor expression by osteoblastic cells." *Endocrinology* **141**(6): 2075-2083.



- Saftig, P., E. Hunziker, O. Wehmeyer, S. Jones, A. Boyde, W. Rommerskirch, J. D. Moritz, P. Schu and K. von Figura (1998). "Impaired osteoclastic bone resorption leads to osteopetrosis in cathepsin-K-deficient mice." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(23): 13453-13458.
- Saijo, M., R. Kitazawa, M. Nakajima, M. Kurosaka, S. Maeda and S. Kitazawa (2003). "Heparanase mRNA expression during fracture repair in mice." Histochem Cell Biol **120**(6): 493-503.
- Sakai, A. and T. Nakamura (2001). "Changes in trabecular bone turnover and bone marrow cell development in tail-suspended mice." J Musculoskel Neuron Interact **1**(4): 387-392.
- Sakata, T., A. Sakai, H. Tsurukami, N. Okimoto, Y. Okazaki, S. Ikeda, T. Norimura and T. Nakamura (1999). "Trabecular bone turnover and bone marrow cell development in tail-suspended mice." J Bone Miner Res **14**(9): 1596-1604.
- Salim, A., R. P. Nacamuli, E. F. Morgan, A. J. Giaccia and M. T. Longaker (2004). "Transient changes in oxygen tension inhibit osteogenic differentiation and Runx2 expression in osteoblasts." J Biol Chem **279**(38): 40007-40016.
- Saller, M. M., W. C. Prall, D. Docheva, V. Schonitzer, T. Popov, D. Anz, H. Clausen-Schaumann, W. Mutschler, E. Volkmer, M. Schieker and H. Polzer (2012). "Increased stemness and migration of human mesenchymal stem cells in hypoxia is associated with altered integrin expression." Biochem Biophys Res Commun **423**(2): 379-385.
- Satokata, I., L. Ma, H. Ohshima, M. Bei, I. Woo, K. Nishizawa, T. Maeda, Y. Takano, M. Uchiyama, S. Heaney, H. Peters, Z. Tang, R. Maxson and R. Maas (2000). "Mx2 deficiency in mice causes pleiotropic defects in bone growth and ectodermal organ formation." Nat Genet **24**(4): 391-395.
- Savoirey, G., L. Jean-Claude, B. Yves, G. Angélique and T. Stéphane (2003). "Normo- and hypobaric hypoxia: are there any physiological differences?" Eur J Appl Physiol **89**: 122-126.
- Schinke, T., C. Amendt, A. Trindl, O. Poschke, W. Muller-Esterl and W. Jahnen-Dechent (1996). "The serum protein alpha2-HS glycoprotein/fetuin inhibits apatite formation in vitro and in mineralizing calvaria cells. A possible role in mineralization and calcium homeostasis." J Biol Chem **271**(34): 20789-20796.
- Schmidt-Bleek, K., H. Schell, N. Schulz, P. Hoff, C. Perka, F. Buttgerit, H. D. Volk, J. Lienau and G. N. Duda (2012). "Inflammatory phase of bone healing initiates the regenerative healing cascade." Cell Tissue Res **347**(3): 567-573.
- Schofield, R. (1978). "The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell." Blood Cells **4**(1-2): 7-25.
- Schwartz, C. (2010). "Bilan de 15 ans d'utilisation des substituts osseux de synthèse en chirurgie orthopédique et en traumatologie." e-mémoires de l'Académie Nationale de Chirurgie, **9**(2): 76-86.
- Seeman, E. and P. D. Delmas (2006). "Bone quality--the material and structural basis of bone strength and fragility." N Engl J Med **354**(21): 2250-2261.
- Semenza, G. L., M. K. Neifelt, S. M. Chi and S. E. Antonarakis (1991). "Hypoxia-inducible nuclear factors bind to an enhancer element located 3' to the human erythropoietin gene." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(13): 5680-5684.
- Shahnazari, M., P. Kurimoto, B. M. Boudignon, B. E. Orwoll, D. D. Bikle and B. P. Halloran (2012). "Simulated spaceflight produces a rapid and sustained loss of

- osteoprogenitors and an acute but transitory rise of osteoclast precursors in two genetic strains of mice." Am J Physiol Endocrinol Metab **303**(11): E1354-1362.
- Shapiro, F. (2008). "Bone development and its relation to fracture repair. the role of mesenchymal osteoblasts and surface osteoblasts." European cells and materials **15**: 53-76.
- Sheu, T. J., E. M. Schwarz, D. A. Martinez, R. J. O'Keefe, R. N. Rosier, M. J. Zuscik and J. E. Puzas (2003). "A phage display technique identifies a novel regulator of cell differentiation." J Biol Chem **278**(1): 438-443.
- Silver, M., M. J. Corwin, A. Bazan, A. Gettinger, C. Enny and H. L. Corwin (2006). "Efficacy of recombinant human erythropoietin in critically ill patients admitted to a long-term acute care facility: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial." Crit Care Med **34**(9): 2310-2316.
- Siminovitch, L., E. A. McCulloch and J. E. Till (1963). "The Distribution of Colony-Forming Cells among Spleen Colonies." J Cell Physiol **62**: 327-336.
- Simonet, W. S., D. L. Lacey, C. R. Dunstan, M. Kelley, M. S. Chang, R. Luthy, H. Q. Nguyen, S. Wooden, L. Bennett, T. Boone, G. Shimamoto, M. DeRose, R. Elliott, A. Colombero, H. L. Tan, G. Trail, J. Sullivan, E. Davy, N. Bucay, L. Renshaw-Gegg, T. M. Hughes, D. Hill, W. Pattison, P. Campbell, S. Sander, G. Van, J. Tarpley, P. Derby, R. Lee and W. J. Boyle (1997). "Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density." Cell **89**(2): 309-319.
- Singh, P., P. Hu, J. Hoggatt, A. Moh and L. M. Pelus (2012). "Expansion of bone marrow neutrophils following G-CSF administration in mice results in osteolineage cell apoptosis and mobilization of hematopoietic stem and progenitor cells." Leukemia **26**(11): 2375-2383.
- Smith, S. M., M. E. Wastney, B. V. Morukov, I. M. Larina, L. E. Nyquist, S. A. Abrams, E. N. Taran, C. Y. Shih, J. L. Nillen, J. E. Davis-Street, B. L. Rice and H. W. Lane (1999). "Calcium metabolism before, during, and after a 3-mo spaceflight: kinetic and biochemical changes." Am J Physiol **277**(1 Pt 2): R1-10.
- Solheim, E. (1998). "Growth factors in bone." Int Orthop **22**(6): 410-416.
- Soltanoff, C. S., S. Yang, W. Chen and Y. P. Li (2009). "Signaling networks that control the lineage commitment and differentiation of bone cells." Crit Rev Eukaryot Gene Expr **19**(1): 1-46.
- Sowa, H., H. Kaji, T. Yamaguchi, T. Sugimoto and K. Chihara (2002). "Activations of ERK1/2 and JNK by transforming growth factor beta negatively regulate Smad3-induced alkaline phosphatase activity and mineralization in mouse osteoblastic cells." J Biol Chem **277**(39): 36024-36031.
- Spatz, J. M., R. Ellman, A. M. Cloutier, L. Louis, M. van Vliet, L. J. Suva, D. Dwyer, M. Stolina, H. Z. Ke and M. L. Bouxsein (2013). "Sclerostin antibody inhibits skeletal deterioration due to reduced mechanical loading." J Bone Miner Res **28**(4): 865-874.
- Staines, K. A., V. E. MacRae and C. Farquharson (2012). "The importance of the SIBLING family of proteins on skeletal mineralisation and bone remodelling." Journal of Endocrinology **214**: 241-255.
- Standal, T., M. Borset and A. Sundan (2004). "Role of osteopontin in adhesion, migration, cell survival and bone remodeling." Exp Oncol **26**(3): 179-184.
- Stewart, A. D. and J. Hannan (2000). "Sub-regional tissue morphometry in male athletes and controls using dual X-Ray absorptiometry (DXA)." Int J Sport Nutr Exerc Metab **10**(2): 157-169.

- Stewart, R., J. Goldstein, A. Eberhardt, G. T. Chu and S. Gilbert (2011). "Increasing vascularity to improve healing of a segmental defect of the rat femur." J Orthop Trauma **25**(8): 472-476.
- Street, J., M. Bao, L. deGuzman, S. Bunting, F. V. Peale, Jr., N. Ferrara, H. Steinmetz, J. Hoeffel, J. L. Cleland, A. Daugherty, N. van Bruggen, H. P. Redmond, R. A. Carano and E. H. Filvaroff (2002). "Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(15): 9656-9661.
- Stroncek, J. D. and W. M. Reichert (2008). "Overview of Wound Healing in Different Tissue Types Environment."
- Suda, T., N. Takahashi, N. Udagawa, E. Jimi, M. T. Gillespie and T. J. Martin (1999). "Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families." Endocr Rev **20**(3): 345-357.
- Suda, T., K. Takubo and G. L. Semenza (2011). "Metabolic regulation of hematopoietic stem cells in the hypoxic niche." Cell Stem Cell **9**(4): 298-310.
- Sugimura, R., X. C. He, A. Venkatraman, F. Arai, A. Box, C. Semerad, J. S. Haug, L. Peng, X. B. Zhong, T. Suda and L. Li (2012). "Noncanonical Wnt signaling maintains hematopoietic stem cells in the niche." Cell **150**(2): 351-365.
- Sugiyama, T., H. Kohara, M. Noda and T. Nagasawa (2006). "Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches." Immunity **25**(6): 977-988.
- Sutherland, H. J., P. M. Lansdorp, D. H. Henkelman, A. C. Eaves and C. J. Eaves (1990). "Functional characterization of individual human hematopoietic stem cells cultured at limiting dilution on supportive marrow stromal layers." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(9): 3584-3588.
- Taichman, R. S. and S. G. Emerson (1998). "The role of osteoblasts in the hematopoietic microenvironment." Stem Cells **16**(1): 7-15.
- Takahashi, N., T. Akatsu, N. Udagawa, T. Sasaki, A. Yamaguchi, J. M. Moseley, T. J. Martin and T. Suda (1988). "Osteoblastic cells are involved in osteoclast formation." Endocrinology **123**(5): 2600-2602.
- Takayanagi, H., S. Kim and T. Taniguchi (2002). "Signaling crosstalk between RANKL and interferons in osteoclast differentiation." Arthritis Res **4 Suppl 3**: S227-232.
- Takayanagi, H., K. Ogasawara, S. Hida, T. Chiba, S. Murata, K. Sato, A. Takaoka, T. Yokochi, H. Oda, K. Tanaka, K. Nakamura and T. Taniguchi (2000). "T-cell-mediated regulation of osteoclastogenesis by signalling cross-talk between RANKL and IFN-gamma." Nature **408**(6812): 600-605.
- Takubo, K., N. Goda, W. Yamada, H. Iriuchishima, E. Ikeda, Y. Kubota, H. Shima, R. S. Johnson, A. Hirao, M. Suematsu and T. Suda (2010). "Regulation of the HIF-1alpha level is essential for hematopoietic stem cells." Cell Stem Cell **7**(3): 391-402.
- Tanaka, Y., I. Morimoto, Y. Nakano, Y. Okada, S. Hirota, S. Nomura, T. Nakamura and S. Eto (1995). "Osteoblasts are regulated by the cellular adhesion through ICAM-1 and VCAM-1." J Bone Miner Res **10**(10): 1462-1469.
- Tatsumi, S., K. Ishii, N. Amizuka, M. Li, T. Kobayashi, K. Kohno, M. Ito, S. Takeshita and K. Ikeda (2007). "Targeted ablation of osteocytes induces osteoporosis with defective mechanotransduction." Cell Metab **5**(6): 464-475.

- Teti, A., H. C. Blair, S. L. Teitelbaum, J. A. Kahn, A. Carano, M. Grano, G. Santacrose, P. Schlesinger and A. Zamboni Zallone (1989). "Cytoplasmic pH is regulated in isolated avian osteoclasts by a Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> exchanger." *Boll Soc Ital Biol Sper* **65**(7): 589-595.
- Thraillkill, K. M., C. K. Lumpkin, Jr., R. C. Bunn, S. F. Kemp and J. L. Fowlkes (2005). "Is insulin an anabolic agent in bone? Dissecting the diabetic bone for clues." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **289**(5): E735-745.
- Tian, X. Y., Q. Zhang, R. Zhao, R. B. Setterberg, Q. Q. Zeng, S. J. Iturria, Y. F. Ma and W. S. Jee (2008). "Continuous PGE<sub>2</sub> leads to net bone loss while intermittent PGE<sub>2</sub> leads to net bone gain in lumbar vertebral bodies of adult female rats." *Bone* **42**(5): 914-920.
- Till, J. E. and M. Culloch (1961). "A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells." *Radiat Res* **14**: 213-222.
- Toupadakis, C. A., J. L. Granick, M. Sagy, A. Wong, E. Ghassemi, D. J. Chung, D. L. Borjesson and C. E. Yellowley (2013). "Mobilization of endogenous stem cell populations enhances fracture healing in a murine femoral fracture model." *Cytotherapy* **15**(9): 1136-1147.
- Tran Van, P., A. Vignery and R. Baron (1982). "An electron-microscopic study of the bone-remodeling sequence in the rat." *Cell Tissue Res* **225**(2): 283-292.
- Troen, B. R. (2003). "Molecular mechanisms underlying osteoclast formation and activation." *Exp Gerontol* **38**(6): 605-614.
- Tsubaki, M., C. Kato, M. Manno, M. Ogaki, T. Satou, T. Itoh, T. Kusunoki, Y. Tanimori, K. Fujiwara, H. Matsuoka and S. Nishida (2007). "Macrophage inflammatory protein-1alpha (MIP-1alpha) enhances a receptor activator of nuclear factor kappaB ligand (RANKL) expression in mouse bone marrow stromal cells and osteoblasts through MAPK and PI3K/Akt pathways." *Mol Cell Biochem* **304**(1-2): 53-60.
- Uchida, S., A. Sakai, H. Kudo, H. Otomo, M. Watanuki, M. Tanaka, M. Nagashima and T. Nakamura (2003). "Vascular endothelial growth factor is expressed along with its receptors during the healing process of bone and bone marrow after drill-hole injury in rats." *Bone* **32**(5): 491-501.
- Urist, M. R. (1965). "Bone: formation by autoinduction." *Science* **150**(3698): 893-899.
- Urist, M. R. and B. S. Strates (1971). "Bone morphogenetic protein." *J Dent Res* **50**(6): 1392-1406.
- Utting, J. C., A. M. Flanagan, A. Brandao-Burch, I. R. Orriss and T. R. Arnett (2010). "Hypoxia stimulates osteoclast formation from human peripheral blood." *Cell Biochem Funct* **28**(5): 374-380.
- Uusitalo, H., J. Rantakokko, M. Ahonen, T. Jamsa, J. Tuukkanen, V.-M. Kahari, E. Vuorio and H. T. Aro (2001). "A Metaphyseal Defect Model of the Femur for Studies of Murine Bone Healing." *Bone* **28**(4): 423-429.
- Uusitalo, H., J. Rantakokko, M. Ahonen, T. Jamsa, J. Tuukkanen, V. KaHari, E. Vuorio and H. T. Aro (2001). "A metaphyseal defect model of the femur for studies of murine bone healing." *Bone* **28**(4): 423-429.
- Vaananen, H. K. and M. Horton (1995). "The osteoclast clear zone is a specialized cell-extracellular matrix adhesion structure." *J Cell Sci* **108 ( Pt 8)**: 2729-2732.
- Valdimarsdottir, G., M. J. Goumans, A. Rosendahl, M. Brugman, S. Itoh, F. Lebrin, P. Sideras and P. ten Dijke (2002). "Stimulation of Id1 expression by bone morphogenetic protein is sufficient and necessary for bone morphogenetic protein-induced activation of endothelial cells." *Circulation* **106**(17): 2263-2270.

- Vallet, S., S. Pozzi, K. Patel, N. Vaghela, M. T. Fulciniti, P. Veiby, T. Hideshima, L. Santo, D. Cirstea, D. T. Scadden, K. C. Anderson and N. Raje (2011). "A novel role for CCL3 (MIP-1alpha) in myeloma-induced bone disease via osteocalcin downregulation and inhibition of osteoblast function." *Leukemia* **25**(7): 1174-1181.
- van Buul, J. D., C. Voermans, V. van den Berg, E. C. Anthony, F. P. Mul, S. van Wetering, C. E. van der Schoot and P. L. Hordijk (2002). "Migration of human hematopoietic progenitor cells across bone marrow endothelium is regulated by vascular endothelial cadherin." *J Immunol* **168**(2): 588-596.
- van de Kamp, J., W. Jahnen-Dechent, B. Rath, R. Knuechel and S. Neuss (2013). "Hepatocyte growth factor-loaded biomaterials for mesenchymal stem cell recruitment." *Stem Cells Int* **2013**: 892065.
- Vandamme, K., X. Holy, M. Bensidhoum, M. Deschepper, D. Logeart-Avramoglou, I. Naert, J. Duyck and H. Petite (2012). "Impaired osteoblastogenesis potential of progenitor cells in skeletal unloading is associated with alterations in angiogenic and energy metabolism profile." *Biomed Mater Eng* **22**(4): 219-226.
- Venkatesan, J. and S. K. Kim (2010). "Chitosan composites for bone tissue engineering--an overview." *Mar Drugs* **8**(8): 2252-2266.
- Vico, L., D. Chappard, S. Palle, A. V. Bakulin, V. E. Novikov and C. Alexandre (1988). "Trabecular bone remodeling after seven days of weightlessness exposure (BIOCOSMOS 1667)." *Am J Physiol* **255**(2 Pt 2): R243-247.
- Visigalli, D., A. Strangio, D. Palmieri and P. Manduca (2010). "Hind limb unloading of mice modulates gene expression at the protein and mRNA level in mesenchymal bone cells." *BMC Musculoskelet Disord* **11**: 147.
- Visnjic, D., Z. Kalajzic, D. W. Rowe, V. Katavic, J. Lorenzo and H. L. Aguila (2004). "Hematopoiesis is severely altered in mice with an induced osteoblast deficiency." *Blood* **103**(9): 3258-3264.
- Volpon, J. B. (1994). "Nonunion using a canine model." *Arch Orthop Trauma Surg* **113**(6): 312-317.
- Wagegg, M., T. Gaber, F. L. Lohanatha, M. Hahne, C. Strehl, M. Fangradt, C. L. Tran, K. Schonbeck, P. Hoff, A. Ode, C. Perka, G. N. Duda and F. Buttgerit (2012). "Hypoxia promotes osteogenesis but suppresses adipogenesis of human mesenchymal stromal cells in a hypoxia-inducible factor-1 dependent manner." *PLoS One* **7**(9): e46483.
- Wan, C., S. R. Gilbert, Y. Wang, X. Cao, X. Shen, G. Ramaswamy, K. A. Jacobsen, Z. S. Alaql, A. W. Eberhardt, L. C. Gerstenfeld, T. A. Einhorn, L. Deng and T. L. Clemens (2008). "Activation of the hypoxia-inducible factor-1alpha pathway accelerates bone regeneration." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(2): 686-691.
- Wang, D. S., K. Yamazaki, K. Nohtomi, K. Shizume, K. Ohsumi, M. Shibuya, H. Demura and K. Sato (1996). "Increase of vascular endothelial growth factor mRNA expression by 1,25-dihydroxyvitamin D3 in human osteoblast-like cells." *J Bone Miner Res* **11**(4): 472-479.
- Wang, Y., C. Wan, L. Deng, X. Liu, X. Cao, S. R. Gilbert, M. L. Bouxsein, M. C. Faugere, R. E. Guldberg, L. C. Gerstenfeld, V. H. Haase, R. S. Johnson, E. Schipani and T. L. Clemens (2007). "The hypoxia-inducible factor alpha pathway couples angiogenesis to osteogenesis during skeletal development." *J Clin Invest* **117**(6): 1616-1626.
- Ward, A. C., I. Touw and A. Yoshimura (2000). "The Jak-Stat pathway in normal and perturbed hematopoiesis." *Blood* **95**(1): 19-29.

- Wasnik, S., A. Tiwari, M. A. Kirkland and G. Pande (2012). "Osteohematopoietic stem cell niches in bone marrow." *Int Rev Cell Mol Biol* **298**: 95-133.
- Weber, A. J., G. Li, R. Kalak, J. Street, F. Buttgereit, C. R. Dunstan, M. J. Seibel and H. Zhou (2010). "Osteoblast-targeted disruption of glucocorticoid signalling does not delay intramembranous bone healing." *Steroids* **75**(3): 282-286.
- Weber, I. T., R. W. Harrison and R. V. Iozzo (1996). "Model structure of decorin and implications for collagen fibrillogenesis." *J Biol Chem* **271**(50): 31767-31770.
- Winkler, I. G., N. A. Sims, A. R. Pettit, V. Barbier, B. Nowlan, F. Helwani, I. J. Poulton, N. van Rooijen, K. A. Alexander, L. J. Raggatt and J. P. Levesque (2010). "Bone marrow macrophages maintain hematopoietic stem cell (HSC) niches and their depletion mobilizes HSCs." *Blood* **116**(23): 4815-4828.
- Wozney, J. M., V. Rosen, A. J. Celeste, L. M. Mitsock, M. J. Whitters, R. W. Kriz, R. M. Hewick and E. A. Wang (1988). "Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities." *Science* **242**(4885): 1528-1534.
- Wraighte, P. J. and B. E. Scammell (2007). Principles of fracture healing.
- Wronski, T. J. and E. R. Morey (1982). "Skeletal abnormalities in rats induced by simulated weightlessness." *Metab Bone Dis Relat Res* **4**(1): 69-75.
- Xie, Y., T. Yin, W. Wiegnaebe, X. C. He, D. Miller, D. Stark, K. Perko, R. Alexander, J. Schwartz, J. C. Grindley, J. Park, J. S. Haug, J. P. Wunderlich, H. Li, S. Zhang, T. Johnson, R. A. Feldman and L. Li (2009). "Detection of functional haematopoietic stem cell niche using real-time imaging." *Nature* **457**(7225): 97-101.
- Xiong, J. and C. A. O'Brien (2012). "Osteocyte RANKL: New Insights Into the Control of Bone Remodeling." *Journal of Bone and Mineral Research* **27**(3): 499-505.
- Xu, N., H. Liu, F. Qu, J. Fan, K. Mao, Y. Yin, J. Liu, Z. Geng and Y. Wang (2013). "Hypoxia inhibits the differentiation of mesenchymal stem cells into osteoblasts by activation of Notch signaling." *Exp Mol Pathol* **94**(1): 33-39.
- Yahata, T., Y. Muguruma, S. Yumino, Y. Sheng, T. Uno, H. Matsuzawa, M. Ito, S. Kato, T. Hotta and K. Ando (2008). "Quiescent human hematopoietic stem cells in the bone marrow niches organize the hierarchical structure of hematopoiesis." *Stem Cells* **26**(12): 3228-3236.
- Yamaguchi, A., T. Ishizuya, N. Kintou, Y. Wada, T. Katagiri, J. M. Wozney, V. Rosen and S. Yoshiki (1996). "Effects of BMP-2, BMP-4, and BMP-6 on osteoblastic differentiation of bone marrow-derived stromal cell lines, ST2 and MC3T3-G2/PA6." *Biochem Biophys Res Commun* **220**(2): 366-371.
- Yamazaki, S., H. Ema, G. Karlsson, T. Yamaguchi, H. Miyoshi, S. Shioda, M. M. Taketo, S. Karlsson, A. Iwama and H. Nakauchi (2011). "Nonmyelinating Schwann cells maintain hematopoietic stem cell hibernation in the bone marrow niche." *Cell* **147**(5): 1146-1158.
- Yanai, N., T. Satoh and M. Obinata (1991). "Endothelial cells create a hematopoietic inductive microenvironment preferential to erythropoiesis in the mouse spleen." *Cell Struct Funct* **16**(1): 87-93.
- Yang, C. M., C. S. Chien, C. C. Yao, L. D. Hsiao, Y. C. Huang and C. B. Wu (2004). "Mechanical strain induces collagenase-3 (MMP-13) expression in MC3T3-E1 osteoblastic cells." *J Biol Chem* **279**(21): 22158-22165.
- Yang, X., K. Matsuda, P. Bialek, S. Jacquot, H. C. Masuoka, T. Schinke, L. Li, S. Brancorsini, P. Sassone-Corsi, T. M. Townes, A. Hanauer and G. Karsenty (2004). "ATF4 is a substrate

- of RSK2 and an essential regulator of osteoblast biology; implication for Coffin-Lowry Syndrome." *Cell* **117**(3): 387-398.
- Yao, L., T. Yokota, L. Xia, P. W. Kincade and R. P. McEver (2005). "Bone marrow dysfunction in mice lacking the cytokine receptor gp130 in endothelial cells." *Blood* **106**(13): 4093-4101.
- Yin, T. and L. Li (2006). "The stem cell niches in bone." *J Clin Invest* **116**(5): 1195-1201.
- Yoshihara, H., F. Arai, K. Hosokawa, T. Hagiwara, K. Takubo, Y. Nakamura, Y. Gomei, H. Iwasaki, S. Matsuoka, K. Miyamoto, H. Miyazaki, T. Takahashi and T. Suda (2007). "Thrombopoietin/MPL signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence and interaction with the osteoblastic niche." *Cell Stem Cell* **1**(6): 685-697.
- Yoshitake, F., S. Itoh, H. Narita, K. Ishihara and S. Ebisu (2008). "Interleukin-6 directly inhibits osteoclast differentiation by suppressing receptor activator of NF-kappaB signaling pathways." *J Biol Chem* **283**(17): 11535-11540.
- Younger, E. M. and M. W. Chapman (1989). "Morbidity at bone graft donor sites." *J Orthop Trauma* **3**(3): 192-195.
- Yousfi, M., F. Lasmoles, A. Lomri, P. Delannoy and P. J. Marie (2001). "Increased bone formation and decreased osteocalcin expression induced by reduced Twist dosage in Saethre-Chotzen syndrome." *J Clin Invest* **107**(9): 1153-1161.
- Yun, H. J. and D. Y. Jo (2003). "Production of stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) and expression of CXCR4 in human bone marrow endothelial cells." *J Korean Med Sci* **18**(5): 679-685.
- Zerath, E., X. Holy, S. G. Roberts, C. Andre, S. Renault, M. Hott and P. J. Marie (2000). "Spaceflight inhibits bone formation independent of corticosteroid status in growing rats." *J Bone Miner Res* **15**(7): 1310-1320.
- Zhang, J., C. Niu, L. Ye, H. Huang, X. He, W. G. Tong, J. Ross, J. Haug, T. Johnson, J. Q. Feng, S. Harris, L. M. Wiedemann, Y. Mishina and L. Li (2003). "Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size." *Nature* **425**(6960): 836-841.
- Zhang, X., E. M. Schwarz, D. A. Young, J. E. Puzas, R. N. Rosier and R. J. O'Keefe (2002). "Cyclooxygenase-2 regulates mesenchymal cell differentiation into the osteoblast lineage and is critically involved in bone repair." *J Clin Invest* **109**(11): 1405-1415.
- Zhang, Z., J. Chen and D. Jin (1998). "Platelet-derived growth factor (PDGF)-BB stimulates osteoclastic bone resorption directly: the role of receptor beta." *Biochem Biophys Res Commun* **251**(1): 190-194.
- Zhao, C., N. Irie, Y. Takada, K. Shimoda, T. Miyamoto, T. Nishiwaki, T. Suda and K. Matsuo (2006). "Bidirectional ephrinB2-EphB4 signaling controls bone homeostasis." *Cell Metab* **4**(2): 111-121.
- Zhou, H., V. Kartsogiannis, Y. S. Hu, J. Elliott, J. M. Quinn, W. J. McKinstry, M. T. Gillespie and K. W. Ng (2001). "A novel osteoblast-derived C-type lectin that inhibits osteoclast formation." *J Biol Chem* **276**(18): 14916-14923.
- Zhou, K., L. Huang, Z. Zhou, C. Hu, W. Liu, J. Zhou and H. Sun (2010). "Wnt and Notch signaling pathways selectively regulating hematopoiesis." *Ann Hematol* **89**(8): 749-757.
- Zhu, K., H. Jiao, S. Li, H. Cao, D. L. Galson, Z. Zhao, X. Zhao, Y. Lai, J. Fan, H. J. Im, D. Chen and G. Xiao (2013). "ATF4 promotes bone angiogenesis by increasing vegf expression and release in the bone environment." *J Bone Miner Res* **28**(9): 1870-1884.

Zou, D., W. Han, S. You, D. Ye, L. Wang, S. Wang, J. Zhao, W. Zhang, X. Jiang, X. Zhang and Y. Huang (2011). "In vitro study of enhanced osteogenesis induced by HIF-1alpha-transduced bone marrow stem cells." Cell Prolif **44**(3): 234-243.





Je tiens à remercier chaleureusement les membres de ce jury d'avoir spontanément accepté d'évaluer ce travail. En espérant que ce manuscrit vous ait été agréable à lire, tout comme j'ai eu plaisir à l'écrire.

Je profite des dernières pages de ce manuscrit pour exprimer toute ma reconnaissance aux personnes qui ont contribué de près ou de loin à ce travail de thèse, pour leur soutien tout au long de ces quatre années.

Je ne dresserai pas de liste exhaustive, néanmoins, je citerai en premier lieu Monsieur Holy, qui a cru en moi et m'a donné la chance de travailler sur ce sujet. Je vous en serai toujours reconnaissante. Merci à vous, à Jean-Marc (et à son humour !), à Marie-Caroline et à Jean-Jacques pour l'excellence de votre encadrement qui a permis de mener à bien ce projet. A maintes reprises, j'ai eu l'occasion de constater à quel point vos qualités scientifiques égalaient vos qualités humaines...cela n'a pas de prix. Merci Jean-Marc pour ton aide précieuse et le tout le temps que tu m'as consacré.

Un immense **MERCI** à tous les membres de l'équipe SHRT/TCRT qui ont participé à ce projet, et l'ont vu grandir au jour le jour, avec toutes les difficultés, les remises en questions et les plaisirs qu'il m'a procurés.

*Catherine, Dominique, Laurent, Sylvie, Sophie, Xavier B.*

*Martine*, C'est grâce à vous tous que j'ai eu la chance de prendre conscience de la signification et de l'importance de l'esprit d'équipe. Les manipes caisson à vos cotés resteront parmi mes souvenirs de thèse les plus difficiles...mais aussi sans l'ombre d'un doute parmi les meilleurs. Je ne connais pas beaucoup de laboratoires dont l'ensemble du personnel accepte, dans l'efficacité et la bonne humeur, de rester jusqu'à 3 heures du matin pour aider la p'tite thésarde à mener à bien ses manipes...

Vous m'avez aidé à « porter » les manipes, et plus encore, vous m'avez « supportée » pendant ces quelques années (et je dois dire *Sophie* encore un petit plus ces derniers mois dans le bureau...merci).

*Martine*, même si tu ne participes pas de façon directe aux expérimentations, tu ne fais pas pour autant moins partie du laboratoire, et ton soutien m'a été tout autant précieux.

Sans oublier *Christophe, Sylvain et Didier, Jacques et Alexandre* de l'IRBA qui ont permis de rendre les manipes réalisables, ainsi qu'*Adrienne, Bernadette*, et *Denis* de l'INSERM, qui m'ont fait

découvrir un certain nombre de techniques. Merci pour votre gentillesse et votre esprit pédagogique.

Et bien sûr, mes deux conducteurs caisson favoris, *Philippe* et *Christian* (« mouse killer » vous dit merci) !!

Merci aussi aux « nouveaux » du labo, qui n'ont pas eu l'occasion de participer aux manipes, mais qui ont été présents ces derniers mois et m'ont encouragée.

*Marie-Emmanuelle, Graziella (merci pour la mise en page !), Thomas, Florent, Charles.*

Un merci également à tous les gens de la BA 217 et de l'IRBA que j'ai eu l'occasion de rencontrer pendant ces quelques années, et qui ont participé à rendre mon cadre de travail et mon cadre de vie si sympathique, varié et enrichissant...*Priscilla, Simon, Marie-Hélène, Damien, Gilles, Virginie,...* Mention spéciale à « *freundin* », dont l'amitié m'est devenue plus que précieuse en 4 ans ;-)  
Vivement nos prochains voyages !

Merci enfin à mes parents, pour leur soutien indéfectible tout au long de mes études...