Modifications de la composition et de la structure moléculaire du tissu osseux sous l'influence des bisphosphonates

Cécile Olejnik

▶ **To cite this version:**

Cécile Olejnik. Modifications de la composition et de la structure moléculaire du tissu osseux sous l'influence des bisphosphonates. Médecine humaine et pathologie. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2014. Français. NNT : 2014LIL2S023 . tel-01171630

HAL Id: tel-01171630
https://theses.hal.science/tel-01171630

Submitted on 6 Jul 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 DU DROIT ET DE LA SANTE DE LILLE 2

ECOLE DOCTORALE BIOLOGIE-SANTE

ANNEE 2014 N°

THESE

pour l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LILLE 2

Présentée et soutenue publiquement le 04 Juillet 2014

par Cécile OLEJNIK

MODIFICATIONS DE LA COMPOSITION ET DE LA STRUCTURE MOLECULAIRE DU TISSU OSSEUX SOUS L'INFLUENCE DES BISPHOSPHONATES

JURY

Monsieur le Docteur Georges BOIVIN	Rapporteur
Monsieur le Professeur Philippe LESCLOUS	Rapporteur
Madame le Professeur Nathalie AZAROUAL	Examinatrice
Monsieur le Professeur Frédéric CUISINIER	Examinateur
Monsieur le Professeur Bernard CORTET	Examinateur
Monsieur le Professeur Guillaume PENEL	Directeur de thèse

REMERCIEMENTS

Aux membres du jury

A Monsieur le Professeur Guillaume Penel, directeur de ce travail de thèse, que je tiens tout d'abord à remercier pour son accueil chaleureux au sein du laboratoire PMOI EA4490 et pour m'avoir guidée tout au long de mes recherches. Ce travail est le résultat de son soutien constant, du partage de ses connaissances et de ses conseils avisés. Merci également d'avoir su me canaliser et tempérer mes doutes !

A Monsieur le Docteur Georges Boivin, directeur de recherche INSERM de l'UMR1033 de l'Université Claude Bernard Lyon 1, que je remercie de l'honneur et du plaisir de vous compter parmi les membres de mon jury de thèse en qualité de rapporteur.

A Monsieur le Professeur Philippe Lesclous, du laboratoire LIOAD UMR791 de l'Université de Nantes, pour m'avoir accompagnée dans la réalisation de ce travail, pour ses encouragements et la pertinence de ses remarques. Merci d'avoir accepté de juger et d'être rapporteur de ce travail de thèse.

A Madame le Professeur Nathalie Azaroual du laboratoire GRIIOT EA4481 de l'Université de Lille 2, pour sa sympathie, ses conseils constructifs et son soutien dans le déroulement de ce travail. Merci d'avoir accepté de participer à mon jury de thèse.

A Monsieur le Professeur Frédéric Cuisinier, directeur du laboratoire LBN EA4203 de l'Université de Montpellier 1, que je remercie pour me faire l'honneur de participer à mon jury de thèse.

A Monsieur le Professeur Bernard Cortet, membre du laboratoire d'accueil PMOI EA4490, pour avoir accepté de participer à mon jury de thèse. Merci d'avoir suivi ce travail au travers l'œil du statisticien mais surtout du clinicien. Nos conversations ont toujours été enrichissantes et stimulantes, c'est un plaisir d'exposer l'aboutissement de ces travaux de recherche.

Aux membres du laboratoire

A Pierre Hardouin, merci pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire et pour son intérêt sur mon sujet, ses questions et remarques en toute intelligence lors de mes divers exposés, même si je l'avoue, me semblaient parfois impressionnantes et intimidantes dans mes débuts…

Alexandrine During, merci pour sa finesse, sa vivacité d'esprit et son écoute. Outre une compagnie féminine au sein de l'équipe lilloise, tu as su me communiquer ta rigueur et ta passion au niveau scientifique. J'espère avoir l'opportunité de partager de nouveaux projets avec toi.

Guillaume Falgayrac, merci pour sa disponibilité, sa patience et pour avoir su m'initier au monde du Raman. Pardonne moi aussi de t'avoir assailli de diverses interrogations le plus souvent à des heures « tardives ».

Aux nouveaux, Marie-Anne, Xavier, Tristan et Yann, merci pour votre rafraichissante et joyeuse compagnie. Je vous souhaite un avenir satisfaisant et plein de bonnes surprises !

A Marie-Hélène Vieillard, merci pour son expérience et ses conseils sur le sujet.

Aux Boulonnais, j'ai toujours eu de bons contacts avec vous, merci de participer à la richesse et au partage scientifique au sein du laboratoire. Plus particulièrement merci à Séverine Delplace pour le partage technique de ses connaissances et pour les discussions intéressantes que nous avons eu. Merci également à Sara Zogheib, unies dans la même galère, ta compagnie notamment au cours des congrès était des plus agréables (pardon d'avoir voulu te faire visiter tout Lisbonne à pied !), je te souhaite plein de bonheur dans ta vie personnelle.

Aux personnes qui ont participé à la réalisation de ce travail

A Jean Michel Maes du service de Chirurgie maxillo-faciale et Stomatologie du CHRU de Lille, merci pour les contacts sympathiques et la collecte d'échantillons humains (et l'échange de petits flacons alcoolisés !).

Aux membres du laboratoire d'Anatomie de la faculté de Médecine de Lille, Maurice et Franck, merci pour leur gentillesse, leur disponibilité et l'aide dans le prélèvement des échantillons humains.

Aux membres de l'animalerie du DHURE de l'Université Lille2, à Thomas Hubert, merci pour son accueil dans les locaux et pour ses bons conseils. Merci également à Michel, Arnold, Martin et Joël pour leur disponibilité et leur aide dans les expérimentations animales.

A Sylvie Regnier du laboratoire des Processus et Bilans des Domaines Sédimentaires de l'UMR8110 de l'USTL, merci pour la réalisation des lames d'observations et pour son petit mot toujours gentil lors de mes visites.

A Philippe Recourt du laboratoire des Processus et Bilans des Domaines Sédimentaires, l'UMR8110 de l'USTL, merci pour son agréable compagnie et la réalisation des analyses lors des (longues !) séances MEBE.

A Bruno Buys de l'atelier de mécanique de l'U703 de l'INSERM de Lille, merci pour son efficacité dans la réalisation des guides chirurgicaux précieux dans les chirurgies.

A Meryem Tardivel de la plate-forme d'imagerie cellulaire de l'IMPRT IFR114 de Lille, merci pour la formation et ses conseils à l'utilisation du confocal, mais surtout pour sa sympathie et la bouffée d'air frais qui me remontaient toujours le moral.

A Olivier Devos du LASIR, UMR8516 de l'USTL, merci pour l'aide et l'expertise sur les analyses statistiques multivariées, discipline subtile et parfois ardue.

Aux Pink Floyd, merci d'avoir si bien accompagné mes petits rats sédatés.

Aux personnes qui ont fait naître ce goût pour la Recherche

A Yves Bailliez, merci pour ses encouragements, son soutien permanent et pour avoir su communiquer sa curiosité scientifique et sa passion pour la recherche. Cette belle rencontre, m'a inspirée et donné l'envie de plonger dans le monde de la Recherche. C'est avec un mélange d'admiration, de respect et d'amitié que je l'en remercie.

A Renata Polakowska de l'INSERM U837 de Lille, merci pour l'enrichissement à la fois intellectuel et humain apporté lors de mes premiers pas dans le monde de la Recherche. J'ai beaucoup appris à ses côtés, et j'utilise régulièrement encore ses enseignements…

Aux membres du cabinet

A Charles Bianchi, merci pour son accueil, sa confiance, et surtout pour nos discussions parfois légères, parfois philosophiques, mais toujours très intéressantes. Et oui, j'aurais toujours un grand plaisir à discuter avec toi ! Un grand merci également à Karine, Marine et Marion pour leur compagnie chaleureuse et toujours pleine de bonne humeur qui m'a particulièrement aidée dans cette « deuxième semaine » où j'arrivais souvent fatiguée ou préoccupée. Vous avez indirectement contribué à la réalisation de cette thèse par l'ambiance propice et les libertés que j'ai pu avoir au cabinet. Merci !

A mes proches et amis

A mes parents, merci de votre soutien contant et de votre amour. Papa, merci de m'avoir toujours incitée à me dépasser, à me perfectionner et à suivre mes ambitions. Maman, merci pour ton écoute et de m'avoir aidée à relativiser les événements de la vie. Je n'en serais pas là sans vous.

A Sylvain, mon petit frère, merci d'être toi, de ta bonne humeur et d'avoir su entretenir ce grain de folie. Vive Picsou Magazine !

A Geoffrey, mon amoureux, merci d'être présent. Tu es un soutien dans la vie de tous les jours, un réconfort dans les moments difficiles et un rayon de soleil dans nos moments ensemble. Merci aussi de m'avoir sortie de certaines phases apatitiques ces derniers mois… Je n'imagine la vie sans toi. Serait-ce donc bien l'écureuil qui fait la noisette ?

A Stéphane, mon meilleur ami, merci pour ton écoute et nos échanges. Tu es l'ENTP que tout INTP rêve d'avoir. Tu es surtout mon frère d'âme, j'espère que nous resterons proches de longues années…

A mes copin(e)s de fac, Hélène, Sophie, Aurélie et Gwendal, merci des moments passés ensemble et mille excuses pour tous ceux que je n'ai pas eus. Les jours ont sacrément cette tendance à défiler trop rapidement… A moi maintenant de penser à ce fameux raton laveur, et à des appels et soirées plus réguliers. Vous me manquez.

A Malika, merci des moments passés ensemble en copine de galère et de santé mentale défaillante (trentenaire et encore étudiante ?!). Courage pour la suite et surtout je te souhaite un avenir riche en plaisirs et bonheurs…

…et à tous ceux que j'oublie ici, avec qui j'ai partagé petits et grands moments, orientant mes choix et perceptions de la vie, et enrichissant mes expériences et ressentis.

Ce travail a été réalisé au sein du laboratoire de Physiopathologie des Maladies Osseuses Inflammatoires, PMOI EA4490 du Professeur Pierre Hardouin sous la direction du Professeur Guillaume Penel.

Ce travail a bénéficié d'une subvention aux équipes de recherche de l'Institut Français pour la Recherche Odontologique (IFRO) et d'une bourse de recherche de la Société Française de Chirurgie Orale (SFCO).

Il a également fait l'objet de plusieurs publications et communications lors de congrès scientifiques (présentées en annexe).

PUBLICATIONS

I. Olejnik C, Falgayrac G, During A, Vieillard MH, Maes JM, Cortet B, Penel G. Molecular alterations of bone quality in sequesters of bisphosphonates-related osteonecrosis of the jaws. *Osteoporos Int. 2014; 25(2):747-56.*

II. Olejnik C, Falgayrac G, During A, Vieillard MH, Maes JM, Cortet B, Penel G. Modifications physico-chimiques du tissu osseux dans l'ostéonécrose des maxillaires liée aux bisphosphonates. *Revue du Rhumatisme. 2013; 80(S1):A27-A35.*

III. Olejnik C, Falgayrac G, During A, Vieillard MH, Maes JM, Cortet B, Penel G. Analyse Raman *in vivo* des modifications physico-chimiques du tissu osseux maxillaire induites par les bisphosphonates. *Les cahiers de l'ADF. 2012; 28:25-31.*

IV. Olejnik C, Falgayrac G, During A, Penel G. Compatibility of fluorochrome labelling protocol with Raman spectroscopy to study bone formation *Bull Group Int Rech Sci Stomatol Odontol. 2011; 50(2):34-36.*

V. Olejnik C, Falgayrac G, Vieillard MH, Maes JM, Penel G. Molecular interaction between bisphosphonates and human bone: a preliminary study on osteonecrosis sequesters of the jaw *Bull Group Int Rech Sci Stomatol Odontol. 2011; 50(1):53-53.*

COMMUNICATIONS

I. Olejnik C, Cortet B, Vieillard MH, Falgayrac G, During A, Penel G. Physicochemical changes of newly-formed bone in bisphosphonates-treated rat *calvaria. IADR, 25-28 juin 2014 Captown, Afrique du Sud* (communication affichée).

II. Olejnik C, Falgayrac G, During A, Vieillard MH, Maes JM, Cortet B, Penel G. Modifications physico-chimiques du tissu osseux dans l'ostéonécrose des maxillaires liée aux bisphosphonates. *27e congrès français de Rhumatologie, 1-3 décembre 2013, Paris* (communication poster commenté, faisant lieu à la publication dans la *Revue du Rhumatisme*).

III. Olejnik C, Falgayrac G, During A, Vieillard MH, Maes JM, Cortet B, Penel G. Analyse Raman du profil de minéralisation dans l'ostéonécrose des maxillaires *Journées du Forum des Jeunes Chercheurs en Odontologie, 11-12 septembre 2013, Strasbourg* (communication affichée).

IV. Olejnik C, Falgayrac G, During A, Vieillard MH, Maes JM, Cortet B, Penel G. Bone quality evaluation upon bisphosphonates uptake: a microspectroscopy Raman study of jaw bone sequesters *Congrès European Calcified Tissue Society (ECTS), 18-21 mai 2013, Lisbonne, Portugal* (communication orale et affichée).

V. Olejnik C, Falgayrac G, Penel G. Modifications de la qualité osseuse induites *in vivo* par les bisphosphonates chez le rat. *Journées communes des Collèges Nationaux des Enseignants des sous-sections 57-03 et 58-03, 6-7 septembre 2012, Nancy* (communication orale primée).

VI. Olejnik C, Falgayrac G, During A, Penel G. Compatibilité du marquage aux cyclines dans l'analyse Raman de la formation osseuse *in vivo*. *Journées du Forum des Jeunes Chercheurs en Odontologie, 15-16 septembre 2011, Brest* (communication orale et affichée, faisant lieu à la publication dans le *bulletin du GIRSO*).

VII. Olejnik C, Falgayrac G, Vieillard MH, Maes JM, Penel G. Analyse Raman des modifications osseuses des bisphosphonates : apport de l'analyse statistique multivariée. *13e Journées Françaises de Biologie des Tissus Minéralisés (JFBTM), 25-27 mai 2011, Paris* (communication affichée primée).

VIII. Olejnik C, Falgayrac G, Vieillard MH, Maes JM, Penel G. Interactions moléculaires entre les bisphosphonates et l'os humain : une étude préliminaire de séquestres d'ostéonécrose des maxillaires. *55e congrès du Groupement International pour la Recherche Scientifique en Stomatologie et Odontologie (GIRSO), 29-30 avril 2011, Lille, France* (communication orale, faisant lieu à la publication dans le *bulletin du GIRSO*).

RESUME

Utilisés dans le traitement de nombreuses pathologies osseuses bénignes (ostéoporose) et malignes (myélome, métastases osseuses), les bisphosphonates ont une action inhibitrice sur la résorption et le remodelage osseux. Ils présentent une forte affinité pour l'os notamment pour les sites à fort remodelage. Ils permettent d'augmenter la masse et la densité de minéralisation osseuses. Les conséquences moléculaires de leur incorporation, en particulier dans les sites osseux à fort remodelage, restent encore à élucider. Ce travail se propose donc d'étudier à l'échelle moléculaire l'impact des bisphosphonates sur la composition et la structure du tissu osseux à partir de deux modèles de forte accumulation. Un modèle de néoformation osseuse chez le rat en site crânien et des échantillons issus de séquestres humains d'ostéonécrose des maxillaires liée aux bisphosphonates sont étudiés par microscopie électronique à balayage environnemental et microspectrométrie Raman. Nos résultats indiquent que, dans ces conditions, les bisphosphonates sont à l'origine de modifications du contenu minéral du tissu osseux et provoquent des altérations structurales concernant les phases minérale et organique. En particulier, une hyperminéralisation est mise en évidence dans le contexte physiopathologique spécifique de l'ostéonécrose des maxillaires liée aux bisphosphonates. Cette altération résulterait de processus de minéralisation secondaire avancés liés à l'inhibition du remodelage continu des maxillaires par les bisphosphonates. De plus, les modifications de la structure cristalline observées dans les deux modèles témoignent d'un effet direct des bisphosphonates lié aux interactions avec la maille cristalline. Enfin, une perturbation des phénomènes de stabilisation de la matrice collagénique au cours de la néoformation osseuse est suggérée et peut être attribuée à un effet des bisphosphonates sur les cellules ostéoblastiques. Ce travail a permis d'apporter des informations nouvelles sur l'impact des bisphosphonates sur la qualité osseuse à l'échelle moléculaire.

Mots-clés : Biominéral ; Bisphosphonate ; Matrice organique ; Microspectroscopie Raman ; Minéralisation ; Os ; Qualité osseuse

ABSTRACT

Bisphosphonates (BP) are known for their anti-resorptive effects in benign (osteoporosis) and malignant bone diseases (myeloma, bone metastasis). Their strong affinity for biominerals allows them a targeting for specific bone remodeling sites and a prolonged storage within bone. Their clinical properties are based on the net increase of bone mass and mineral density. Little is known about molecular changes upon BP uptake in high turnover bone sites. Therefore, the aim of the present work was to examine intrinsic bone material properties in a high cumulative BP context. Two different situations were analyzed: the newly-formed bone in rat *calvaria* bone defect during zoledronic acid (ZA) administration, and human bone sequesters from bisphosphonates-related osteonecrosis of the jaws. The calcium distribution parameters – the weighted mean, the homogeneity and the portion of highly concentration areas of calcium – were evaluated using the quantitative backscattered electron imaging (qBEI). The physicochemical parameters of bone samples – mineral to organic ratio, relative proteoglycan content, crystallinity, monohydrogen phosphate content, type-B carbonate substitution, and hydroxyproline to proline ratio – were evaluated using the Raman microspectroscopy. Additionally, a chemometric discriminant method was used to identify representative Raman spectral features of human bone sequesters exposed to BP. In the newly formed bone, crystallinity and hydroxyproline to proline ratio were lower in ZA-treated rats. That indicate both mineral and collagenic components are altered upon ZA uptake during bone healing. In jaw bone sequesters, the present results show that BP are linked to an overmineralization and a decrease of crystallinity. The ultrastructural modifications described in the present work could be attributed to: i) bisphosphonates effects on the secondary mineralization, ii) the BP mineral binding/interaction consequences on the crystal lattice, and iii) interestingly to its potential contribution on the osteoblastic function. This work contributes to clarify the molecular impacts of high cumulative bisphosphonates uptake on bone quality.

Keywords: Biomineral; Bisphosphonate; Bone; Bone quality; Mineralization; Organic matrix; Raman microspectroscopy

Table des matières

ABREVIATIONS ..... **XIII**

AVANT-PROPOS ..... **XV**

CHAPITRE 1. **INTRODUCTION** **16**

1.1 TISSU OSSEUX ET QUALITE OSSEUSE **17**

1.1.1 Organisation structurale du tissu osseux 17
1.1.2 Composition du tissu osseux 20
1.1.3 Qualité osseuse 28

1.2 INCIDENCE DES BISPHOSPHONATES SUR LA QUALITE OSSEUSE **31**

1.2.1 Structure moléculaire des bisphosphonates 31
1.2.2 Liaison / interaction des bisphosphonates à la maille apatitique 32
1.2.3 Action antirésorptive des bisphosphonates 35
1.2.4 Modifications moléculaires du tissu osseux induites par les bisphosphonates 36

CHAPITRE 2. **OBJECTIFS** **40**

CHAPITRE 3. **MATERIELS ET METHODES** **42**

3.1 MODELE DE NEOFORMATION OSSEUSE CHEZ LE RAT **43**

3.1.1 Animaux 43
3.1.2 Modèle chirurgical 43
3.1.3 Modalités d'injection 44
3.1.4 Préparation des échantillons 45
3.1.5 Choix des zones d'analyses 46
3.1.6 Détermination du gain/perte relatif lié à la néoformation osseuse 47

3.2 ETUDE D'ECHANTILLONS CLINIQUES ISSUS DE L'OSTEONECROSE DES MAXILLAIRES LIEE AUX BISPHOSPHONATES **48**

3.2.1 Séquestres osseux d'ostéonécrose des maxillaires liée aux bisphosphonates 48
3.2.2 Echantillons contrôles 50
3.2.3 Préparations des échantillons 50

3.2.4 Choix des zones d'analyse 50

3.3 MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A BALAYAGE ENVIRONNEMENTALE 51

3.3.1 Obtention du profil de distribution de densité de minéralisation osseuse 51
3.3.2 Paramètres liés à la distribution de la densité de minéralisation osseuse 53
3.3.3 Choix des zones d'analyse 53

3.4 MICROSPECTROSCOPIE RAMAN 54

3.4.1 Acquisition des spectres Raman 54
3.4.2 Paramètres physicochimiques 55
3.4.3 Compatibilité avec le marquage fluorescent 57

3.5 TRAITEMENTS STATISTIQUES 58

3.6 ANALYSE STATISTIQUE MULTIVARIEE 58

CHAPITRE 4. **RESULTATS 60**

4.1 MODIFICATIONS DANS LE MODELE DE NEOFORMATION OSSEUSE CHEZ LE RAT 61

4.1.1 Influence de l'acide zolédronique sur les paramètres physicochimiques 61
4.1.2 Influence du fractionnement de la dose 63
4.1.3 Influence du dosage 64
4.1.4 Etude des corrélations entre les paramètres physicochimiques 65

4.2 MODIFICATIONS DES SEQUESTRES OSSEUX D'OSTEONECROSE DES MAXILLAIRES LIEE AUX BISPHOSPHONATES 67

4.2.1 Influence sur les paramètres physicochimiques 67
4.2.1 Influence de la pathologie sous-jacente en relation avec la molécule et la durée de traitement 68
4.2.2 Apport de l'analyse statistique multivariée 69

CHAPITRE 5. **DISCUSSION 72**

5.1 MODIFICATIONS STRUCTURALES DU MINERAL OSSEUX 73

5.2 MODIFICATIONS STRUCTURALES DU COLLAGENE OSSEUX LORS DE LA NEOFORMATION 76

5.3 VARIATIONS DU CONTENU MINERAL LORS DU REMODELAGE OSSEUX 78

5.4 INTERETS ET LIMITES DES MODELES UTILISES 80

CONCLUSION **83**

TABLE DES FIGURES **84**

TABLE DES TABLEAUX **88**

BIBLIOGRAPHIE **89**

ANNEXES **102**

ABREVIATIONS

Aln : alendronate

ATP : adénosine triphosphate

BMDD : distribution de la densité de minéralisation osseuse (bone mineralization density distribution)

BSE : électrons rétrodiffusés (back-scattered electrons)

BSP : bone sialoprotein

BP : bisphosphonate

CAP : apatite carbonatée

CauV : vertèbre caudale

CI : crête iliaque

Clo : clodronate

Ct : cortical

CTL : contrôle

EDX : spectrométrie X par perte d'énergie (energie-dispersive X-ray spectroscopy)

Eti : étidronate

FPPS : farnésyl pyrophosphate synthétase

FTIR : spectrométrie infrarouge par transformée de Fourier

FWHM : largeur à mi-hauteur (full width at half maximum intensity)

GAG : glycoaminoglycane

Gly : glycine

HAP : hydroxyapatite

HPLC : chromatographie liquide à haute pression (high-performance liquid chromatography)

Ibn : ibandronate

ICP-AES : spectrométrie d'émission atomique par plasma à couplage inductif (inductively coupled plasma–atomic emission spectroscopy)

IGF : insulin-like growth factors

IP : intrapéritonéal

IV : intraveineux

LV : vertèbre lombaire

MEBE : microscopie électronique à balayage environnemental

MEPE : matrix extracellular phosphoglycoprotein

Ner : néridronate

NMR : spectrométrie par résonnance magnétique (nuclear magnetic resonance)

OI : ostéogénèse imparfaite

ONM : ostéonécrose des maxillaires

OP : ostéoporose

OPN : osteopontin

OPNQ : ostéopénique

OVX : ovariectomie

Pam : pamidronate

PG : protéoglycane

Plc : placebo

PLS-DA : analyse statistique multivariée discriminante (partial least square – discriminant analyse)

PMMA : polyméthacrylate de méthyle

PPi : pyrophosphates inorganiques

Pro : proline

Ris : risédronate

SE : électrons secondaires

Tb : trabéculaire

TGF-β : transforming growth factor-β

Til : tiludronate

TCP : phosphate tricalcique

µCT : microtomographie assistée par ordinateur

µRX : microradiographie quantitative

Zol : acide zolédronique

AVANT-PROPOS

Les bisphosphonates sont actuellement des médicaments de choix dans le traitement et la prévention des troubles osseux de résorption excessive. Initialement prescrit dans la maladie de Paget, ils sont également particulièrement indiqués dans la prévention de la perte osseuse et des fractures dans l'ostéoporose post-ménopausique et cortisonique. Ils présentent également un intérêt dans la prise en charge des pathologies ostéolytiques d'origine maligne, notamment dans le cas du myélome multiple et des métastases osseuses des tumeurs solides. Compte tenu de leur efficacité clinique, des progrès thérapeutiques avec l'emploi de nouvelles molécules et de la fréquence croissante de ces pathologies, leur utilisation a considérablement augmenté au cours des dernières décennies. Cependant les mécanismes exacts de liaison à l'échelle moléculaire des bisphosphonates au tissu osseux restent à ce jour mal connus. L'accumulation de ces médicaments au sein du tissu osseux leur confère certes une efficacité reconnue sur l'ostéolyse, mais expose également à certains effets indésirables rares comme l'ostéonécrose des maxillaires et controversés comme les fractures atypiques du fémur. Le rapport bénéfice/risque occulte indéniablement ces potentiels effets secondaires, il n'en demeure pas moins que la connaissance plus précise de leur action sur la qualité osseuse est indispensable. Au-delà de l'imputabilité des bisphosphonates dans ces effets indésirables, les conséquences physicochimiques de ces molécules sur le tissu osseux sont mal connues. Ces informations sont pourtant cruciales pour une meilleure compréhension de leurs effets sur les propriétés biomécaniques et physiologiques de l'os.

Dans ce contexte, le but de ce travail de thèse est d'étudier l'impact des bisphosphonates sur la composition et la structure du tissu osseux à l'échelle moléculaire. Pour cela, deux approches distinctes ont été menées : d'une part sur un modèle de néoformation osseuse chez l'animal sous l'influence de l'acide zolédronique ; et d'autre part sur des échantillons cliniques d'ostéonécroses des maxillaires collectés lors de la consultation pluridisciplinaire du CHRU de Lille spécialisée dans le suivi des patients sous traitement par bisphosphonates.

Chapitre 1. **Introduction**

1.1 Tissu osseux et qualité osseuse

Le tissu osseux est un tissu conjonctif hautement spécialisé présentant à la fois un rôle métabolique (réservoir d'ions minéraux) et un rôle mécanique (protection et soutien). C'est une structure dynamique en perpétuel remaniement et hétérogène dans son architecture et sa composition.

1.1.1 Organisation structurale du tissu osseux

Le tissu osseux possède une organisation multi-échelle spécifique (Figure 1). L'architecture des différents niveaux va influencer ses propriétés mécaniques.

D'un point de vue macroscopique (Figure 1.a), on distingue chez l'adulte l'os cortical (ou compact) et l'os trabéculaire (ou spongieux) (Buckwalter et al., 1996). Cette distinction peut se baser sur un aspect quantitatif macroscopique avec la densité relative (Gibson, 1985) ou la « porosité » (Fratzl and Weinkamer, 2007). C'est cependant l'observation histologique qui permet la discrimination entre ces deux types d'os :

- L'os trabéculaire se caractérise par des travées osseuses interconnectées formant un réseau tridimensionnel et, au contact du tissu médullaire. La moelle osseuse fortement vascularisée est riche en éléments adipeux et hématopoïétiques situés au sein de cavités médullaires (Figure 1.c). Il a une densité relative de 10 à 70 %. Il représente 20 % du squelette (centre des épiphyses osseuses, zones métaphysaire et diaphysaire, os courts et plats). Son rôle est essentiellement métabolique du fait de sa surface d'échange importante avec les tissus interstitiels et de son renouvellement plus rapide. Il participe également aux propriétés mécaniques du tissu osseux par sa résistance à la compression (Rho et al., 1998).
- L'os cortical possède à la différence une structure plus compacte avec une densité relative de 70 à 95 %. La « porosité » est principalement due à la présence des vaisseaux sanguins (Figure 1.b). Il représente environ 80 % du squelette (paroi externe de toute pièce osseuse et la diaphyse des os long). Il assure essentiellement des fonctions de protection et de résistance mécanique. De remodelage continu moins rapide, il diffère également de l'os spongieux par une maturité tissulaire plus importante.

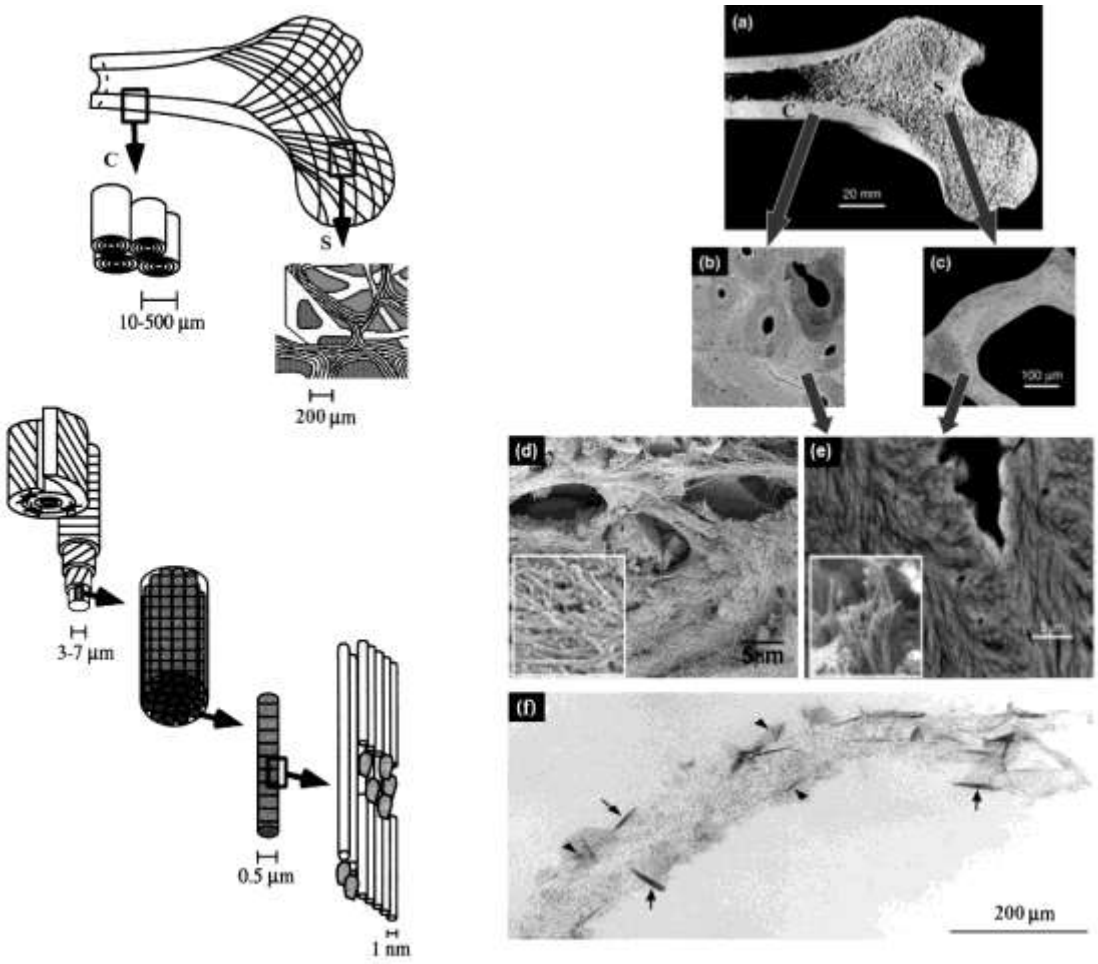

Figure 1 : Organisation structurale du tissu osseux de l'échelle macroscopique à l'échelle de l'ultrastructure : (a) pièce osseuse fémorale, (b) ostéons de l'os cortical, (c) travées de l'os trabéculaire, (d) os fibreux et sa trame collagénique peu organisée, (e) os lamellaire et faisceaux de fibres collagéniques en paquet dense, et (f) fibrille de collagène avec dépôt de cristaux phosphocalciques en aiguille (modifié d'après (Fratzl et al., 2004; Midura et al., 2007; Rho et al., 1998; Su et al., 2003)).

D'un point de vue microscopique, on peut distinguer en fonction de la disposition des fibres de collagène l'os fibreux (ou réticulé) de l'os lamellaire (Buckwalter et al., 1996) :

- L'os fibreux est un os immature formé de novo de manière rapide et caractérisé par une trame collagénique peu organisée et des cristaux phosphocalciques de taille réduite (Figure 1.d) (Su et al., 2003). Il est formé durant l'embryogénèse et lors de la réparation osseuse et, il est rapidement remplacé par de l'os lamellaire. Il peut persister dans certaines zones à fort remodelage d'insertions tendineuses ou ligamentaires, dans les alvéoles dentaires notamment (os fibreux fasciculé). C'est un os de transition de faible résistance mécanique.

- L'os lamellaire est un os remodelé. Il est composé de la juxtaposition concentrique de lamelles (Figure 1.e). Dans le cas de l'os trabéculaire, les lamelles forment un réseau de circonvolutions sinueuses en périphérie des cavités médullaires. Dans le cas de l'os cortical, les lamelles sont organisées autour d'un axe vasculaire central et forment les ostéons, unités élémentaires (Figure 1b). D'autres systèmes lamellaires incomplets sont également présents : plus anciens, ils forment le tissu dit interstitiel (ostéons partiellement remodelés). Les systèmes complets et incomplets contribuent à une hétérogénéité au sein du tissu osseux qui peut également influencer les propriétés mécaniques.

L'organisation en lamelles résulte de l'arrangement parallèle à l'échelle du micron des fibrilles du collagène. Celles-ci sont alignées par paquets denses et selon une direction qui se modifie dans chaque lamelle successive (Weiner et al., 1999). Il est également démontré que les propriétés mécaniques peuvent varier d'une lamelle à l'autre au sein d'un même ostéon (Hengsberger et al., 2002).

D'un point de vue de la nanostucture, les deux constituants majeurs sont les **fibrilles de collagène** sur lesquelles se déposent les **cristaux apatitiques** (Figure 1.f) (Midura et al., 2007, 2009). Les propriétés mécaniques du tissu osseux reposent sur sa dualité organique/minéral où les constituants organiques empêchent la fragilité des cristaux (propriété d'élasticité), tandis que les constituants minéraux permettent la résistance aux sollicitations mécaniques (propriétés de rigidité) (Gupta et al., 2006).

L'architecture de chacun de ces deux constituants est également intimement liée. En effet, la structure et l'organisation fibrillaire du collagène joue un rôle majeur dans les mécanismes de minéralisation du tissu osseux (Figure 2).

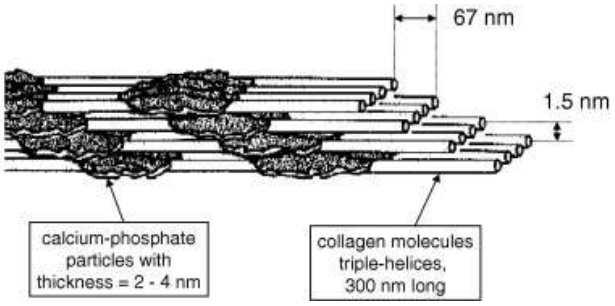

Figure 2 : L'agencement régulier de fibrilles de collagène avec une disposition en quinconce permet de guider la minéralisation : les cristaux apatitiques se déposent initialement dans les zones lacunaires entre les fibrilles et progresse le long de l'axe de ces fibrilles (Fratzl and Weinkamer, 2007).

Les fibrilles de collagène vont initier et orienter la croissance des cristaux phosphocalciques (Landis, 1999; Wang et al., 2012). Les espacements constants et réguliers entre les fibrilles de collagène créent des lacunes de 67 nm de longueur tous les 300 nm dans lesquelles s'organisent les cristaux apatitiques nouvellement formés (Wiesmann et al., 2004). L'axe de croissance des cristaux coïncide avec l'axe longitudinal des fibrilles de collagène. Leurs orientations parallèles permettent la croissance cristalline tout en limitant la taille des cristaux et en contrôlant leur orientation. L'axe des cristaux et l'axe des fibrilles de collagène sont donc proches. L'architecture des cristaux apatitiques est donc liée à celle des fibrilles de collagène.

1.1.2 Composition du tissu osseux

Le tissu osseux est constitué d'une matrice extracellulaire représentant 92 à 95 % du volume osseux, le reste correspondant aux cellules (ostéoblastes, ostéocytes et ostéoclastes). La matrice extracellulaire est constituée d'une matrice organique (22 %) essentiellement collagénique, d'une matrice inorganique (69 %) réservoir métabolique de sels minéraux, et d'une fraction aqueuse (9 %) variant selon l'âge et le degré de minéralisation.

1.1.2.1 La matrice organique

La matrice organique est synthétisée par les ostéoblastes. Elle comprend une substance fibrillaire essentiellement composée de collagène de type I et une substance interfibrillaire de protéines non collagéniques et de lipides (Buckwalter et al., 1996).

Le collagène de type I représente 90 % de la matrice organique. C'est une glycoprotéine fibrillaire présentant au niveau du tissu osseux un arrangement tridimensionnel hélicoïdal. Les chaînes polypeptidiques du collagène (chaînes α) sont organisées en triple hélice gauche. Les chaînes α sont formées de la répétition d'une séquence d'acides aminés de motif Gly–X–Y où, généralement, X est la proline et Y l'hydroxyproline (Gordon and Hahn, 2010). C'est le groupements carboxyle (–COOH) de ces deux acides aminés notamment qui permet la liaison des ions calcium de la matrice minérale lors de l'initiation de la minéralisation (Yang and Cui, 2007; Zhang et al., 2004).

La glycine représente un tiers des acides aminés du collagène, les prolines représentent 10 %, enfin l'hydroxylysine et l'hydroxyproline représentent 21 % à elles

deux. L'hydroxylysine et l'hydroxyproline sont formées à partir de la synthèse polypeptidique par hydroxylation des acides aminés (L-proline et la L-lysine) présents dans les chaînes α. Ces modifications post-traductionnelles sont nécessaires à l'organisation du collagène en tropocollagène, en fibrilles, puis en fibres (Figure 3).

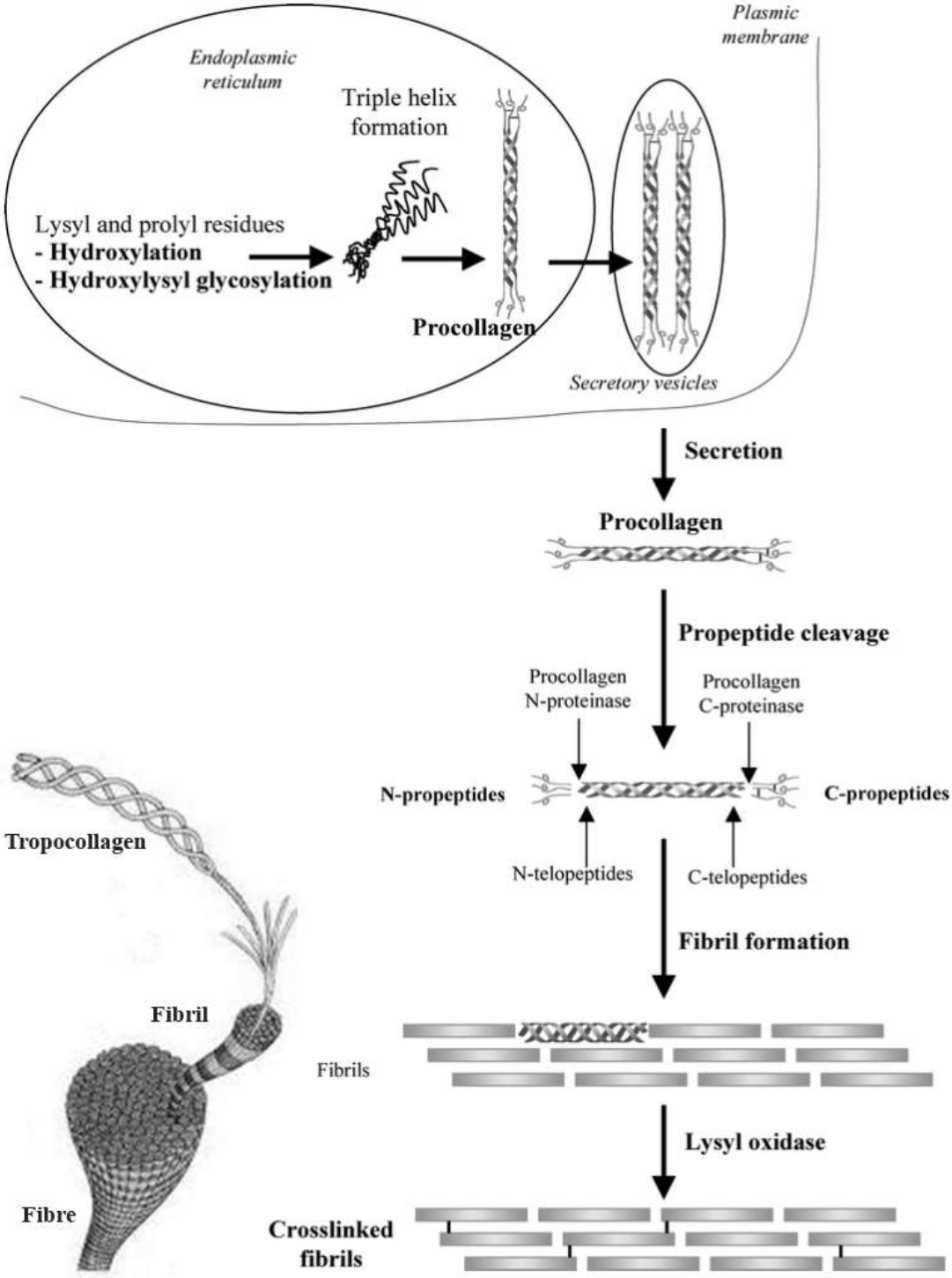

Figure 3 : Formation, modifications post-traductionnelles et maturation du collagène (adapté d'après (Viguet-Carrin et al., 2006)).

Initialement, la formation du procollagène résulte de l'enroulement des trois chaînes polypeptidiques α pour former la triple hélice du collagène. Cette trimérisation est possible grâce à la répétition du motif Gly-X-Y où la glycine joue un rôle central du fait de sa petite taille et par conséquent de son positionnement au centre de la triple hélice. L'enroulement de cette dernière résulte de la répulsion des cycles pyrrolidines des nombreux résidus de proline (chaînes latérales) du fait de l'encombrement stérique. Au sein du propeptide C, la formation de liaisons ponts disulfure inter et intra-chaînes initie l'association entre les différentes chaînes de procollagène.

L'**hydroxylation des résidus de prolines** situés en périphérie joue ensuite un rôle important dans l'alignement des fibrilles lors de l'organisation en triple hélice. Les groupes hydroxyles des résidus d'hydroxyproline contribuent à maintenir la structure en triple hélice en formant des liaisons hydrogène > C=O • • • H–N < entre leurs groupements carboxyle et les résidus de glycines des chaînes adjacentes. Les fibres dans lesquelles les groupes proline n'ont pas été hydroxylés sont beaucoup moins stables que les fibres dont ces groupes ont été hydroxylés (Bella et al., 1995). Cette modification post-traductionnelle d'hydroxylation nécessaire à la stabilité de la triple hélice se déroule dès le passage dans le réticulum endoplasmique des ostéoblastes.

Le procollagène est ensuite transformé en tropocollagène après son passage extracellulaire lorsque les propeptides d'extension sont scindés aux extrémités. Cela permet l'assemblage régulier spontané des molécules de collagène en fibrilles.

L'**établissement de liaisons croisées covalentes** impliquant les chaînes latérales des lysines ou des hydroxylysines (Figure 3) permet ensuite de stabiliser l'alignement des fibrilles et par conséquent est nécessaire à la maturation du collagène en fibres. La réticulation intra-fibrillaire est initiée au niveau des télopeptides C par l'action enzymatique de la lysyl oxidase. Cette étape est nécessaire dans la formation enzymatique de deux aldhéhydes, l'allysine et l'hydroxyallysine. Ceux-ci vont ensuite interagir avec des résidus d'acides aminés de la partie hélicoïdale pour former des liaisons croisées divalentes dites immatures. Ensuite, une nouvelle réaction enzymatique entre deux de ces composés immatures permet la formation de liaisons croisées trivalentes dites matures (Anastasia et al., 2013; Eyre and Weis, 2013; Eyre and Wu, 2005; Saito et al., 2008).

Dans le cas de l'hydroxyallysine, des réactions enzymatiques avec un résidu de lysine ou d'hydroxylysine de la partie hélicoïdale permettent l'obtention des liaisons

croisées matures de type pyrrodinoline. D'autres voies impliquant le télopeptide allysine ont également été décrites par extrapolation chimique et permettraient l'obtention des liaisons croisées matures de type pyrroloine. Néanmoins, la concentration des pyrrolines reste difficile à objectiver du fait de son caractère instable lors de la détection (Adamczyk et al., 2001; Eyre and Wu, 2005).

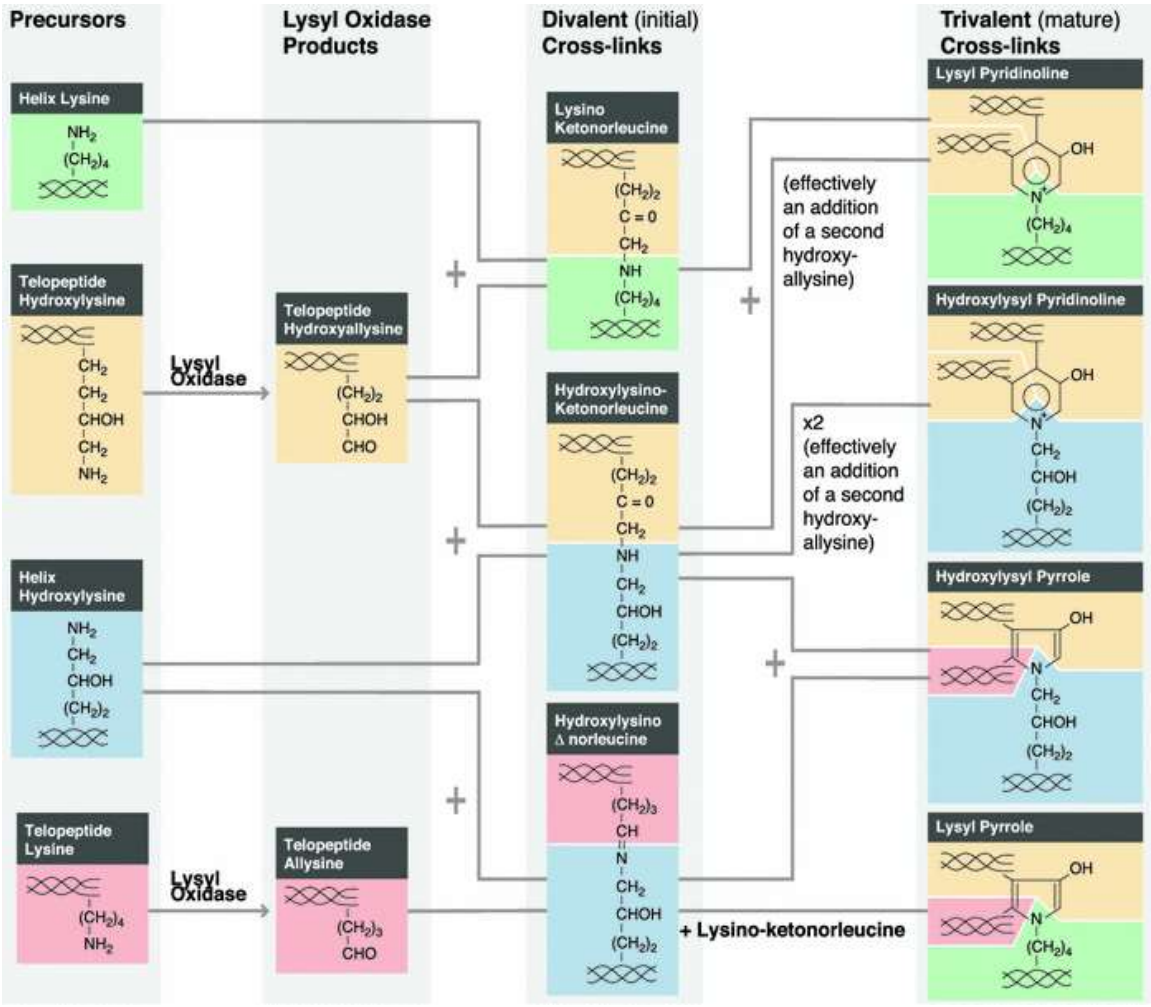

Figure 4 : Différentes voies de formation des liaisons croisées formées à partir de l'hydroxyallysine (Eyre and Weis, 2013)

Chez l'Homme au sein du tissu osseux on observe la persistance de liaisons croisées immatures d'un taux supérieur à celui des liaisons croisées matures de type pyridinoline (ratio avec le collagène total de respectivement 1/1 et 1/5). Le taux de liaison croisées est variable selon l'âge et le secteur osseux avec une prédominance à l'âge adulte et dans l'os cortical (Eyre et al., 1988).

Les protéoglycanes (PG) sont des protéines couplées à des chaînes polysaccharidiques de glycoaminoglycanes (GAG). Les PG constituent près de 10 % des protéines non collagéniques et sont impliqués du fait de leur pouvoir osmotique dans la formation d'un gel hydraté réservoir des divers nutriments, métabolites et hormones du tissu osseux. C'est au sein de cette fraction aqueuse que se concentrent les minéraux nécessaires à l'élaboration des apatites cristallines.

Les PG sont impliqués également dans l'organisation structurale de la matrice collagénique (Keene et al., 2000; Neame et al., 2000) et dans l'initiation et la régulation de la minéralisation par leurs imbrications avec les fibrilles du collagène (Mochida et al., 2009; Lamoureux et al., 2007; Waddington et al., 2003).

D'autres protéines non collagéniques telles que les protéines conjuguées et les protéines plasmatiques sont également retrouvées au sein de la matrice organique (Tableau 1), et présentent des fonctions importantes dans la physiologie osseuse (mécanismes de la minéralisation, phénomènes de couplage résorption/formation osseuse notamment).

Tableau 1 : Les principales protéines non collagéniques, leurs proportions et leurs implications dans la physiologie osseuse

Protéoglycanes	10 %	Organisation de la matrice collagénique et du déroulement de la minéralisation
Protéines conjuguées		
Ostéocalcine	15-25 %	Régulation de la formation osseuse
Ostéonectine	15-25 %	Inhibition de la croissance cristalline
Sialoprotéines (OPN, BSP, MEPE…)	10 %	Régulation de la formation osseuse et de la croissance cristalline
Protéines plasmatiques (fétuine, albumine…)	30-40 %	Régulation du métabolisme phosphocalcique
Facteurs de croissance (TGF-β, IGF…)	< 1 %	Formation osseuse et collagénique

Le rôle de ces protéines dans la minéralisation, et en particulier des protéines conjuguées, réside dans l'existence de sites de liaison au calcium. En effet, l'initiation de la minéralisation se ferait par la liaison des ions calcium au groupement carboxyle situé au niveau des résidus de proline et d'hydroxyproline du collagène (Landis and Silver, 2009; Yang and Cui, 2007; Zhang et al., 2004). Suite à la précipitation des phosphates de

calcium amorphes le long des fibrilles de collagène, les protéines non collagéniques orientent la propagation de la minéralisation le long des fibrilles de collagène. Elles augmenteraient également les interactions entre le collagène et la fraction minérale par l'intermédiaire des ions calcium, participant ainsi aux propriétés mécaniques du tissu osseux (Fantner et al., 2005).

1.1.2.2 La matrice inorganique

Au cours de la minéralisation, la fraction aqueuse intra et inter-fibrillaire devient le lieu d'accumulation des sels minéraux nécessaires à l'élaboration de la matrice minérale. Les sels minéraux les plus fréquents sont le calcium (Ca, 27 %) et le phosphore (P, 12 %). La première phase de la minéralisation correspond à la sécrétion par les ostéoblastes d'une matrice ostéoïde parallèlement aux fibrilles de collagène. La précipitation du calcium et des hydroxydes de phosphate forme des cristaux apatitiques phosphocalciques faiblement matures. Puis les cristaux s'organisent en intra et inter-fibrillaire assurant la minéralisation de la matrice ostéoïde.

D'autres éléments sont présents dans ce gel hydraté, on retrouve principalement des sels minéraux (carbonates CO_3, magnésium Mg, fluor F) ou des sels métalliques (manganèse Mn, cuivre Cu, plomb Pb, fer Fe). Dans le cas des apatites biologiques, ces éléments peuvent se substituer à l'un des éléments des cristaux d'apatite osseux au cours de leur maturation.

Les apatites stœchiométriques (hydroxyapatite, HAP notamment) sont un modèle synthétique d'apatite très pure permettant de comprendre l'organisation structurale et les substitutions des apatites biologiques. Elles présentent une formule chimique stable $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$, avec un ratio Ca/P égal à 1,66.

La maille cristalline de ces HAP est constituée d'un système prismatique hexagonal (maille élémentaire) organisé selon un axe de symétrie sénaire *c*. Cette unité prismatique peut-être subdivisée en trois prismes droits à base losangique dont les côtés constituent les axes cristallographiques *a* et *b*. Ces prismes sont eux-mêmes subdivisés en deux triangles équilatéraux dont le centre correspond à l'axe de symétrie ternaire *c'* parallèle à *c* (Figure 5).

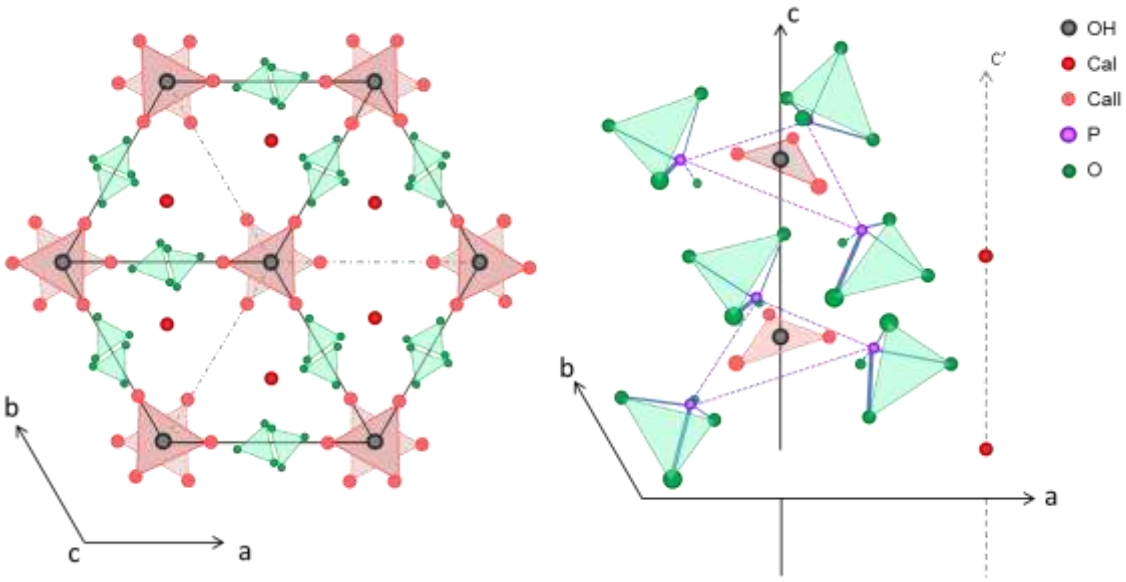

Figure 5 : Maille de l'hydroxyapatite avec, à gauche, la projection sur le plan de base et, à droite, la répartition des ions PO_4^{3-} et Ca^{2+} sur l'axe sénaire *c*.

Les différents ions s'organisent selon l'axe *c* et le plan défini par les axes *a* et *b* :

- OH^- : disposés en position ¼ et ¾ de l'axe c, aux angles du prisme losangique ;
- CaI : 4 ions Ca^{2+} disposés en position 0 et ½ de l'axe c', au centre des triangles équilatéraux ;
- CaII : 6 ions Ca^{2+} organisés en disposition triangulaire et sur le plan ¼ ou ¾ de manière équidistante en périphérie des OH^- ;
- PO_4^{3-} : structures tétraédriques comblant les espaces résiduels entre le CaII, dont le centre P est situé sur le plan ¼ ou ¾ en périphérie des CaII.

Au sein de cette maille élémentaire s'individualise deux types de tunnels traversant le réseau cristallin et délimités par l'arrangement des PO_4^{3-}, centrés sur les positions occupées par les ions Ca^{2+}. Le premier tunnel (tunnel I), le plus petit avec un diamètre de 2,5 Å, est entouré de 6 groupes de PO_4^{3-}, est centré sur les CaI et leurs axes coïncident aux axes *c'* ; quant au deuxième tunnel (tunnel II) avec un diamètre plus important (3 à 4,5 Å), il est centré sur les OH^- et bordé par les CaII, avec un axe coïncidant à l'axe *c*. Ces tunnels sont permettent des échanges d'ions avec la fraction aqueuse périphérique et le stockage de petites molécules comme O_2 ou H_2O au sein des apatites.

Les apatites biologiques possèdent une structure cristallographique très proche de l'HAP synthétique mais varient de par leur composition chimique. Ce sont des apatites non-stœchiométriques déficientes en calcium (ratio Ca/P égal à 1,65) et présentant un fort

taux de substitutions, en ions carbonates (CO_3^{2-}) et en ions monohydrogène phosphates (HPO_4^{2-}) (Rey et al., 2009).

Dans le cas des apatites biologiques, la substitution en CO_3^{2-} est la plus fréquente, ce qui fait du CO_3^{2-} le constituant le plus important (6-7 %) après le Ca^{2+} (40 %), les PO_4^{3-} (18 %). Ces substitutions peuvent s'effectuer sur deux sites :

- La substitution de type A correspond à l'occupation d'un site de l'OH^- dans les tunnels I, accompagné d'un site vacant du 2^e OH^- du même tunnel ;
- La substitution de type B, la plus fréquente, correspond à l'occupation d'un site PO_4^3, accompagné de sites vacants OH^- ou Ca^{2+}. Cette substitution explique aussi pourquoi les apatites biologiques sont déficiente en Ca^{2+} ;
- La substitution mixte de type AB correspond à l'occupation d'un site de l'OH^- et d'un site PO_4^{3-}.

D'autres substitutions par des anions (Cl^-, F^-) ou des cations (Mg^{2+}, K^+, Na^+) sont également retrouvées. Ces différentes substitutions impliquant des ions de charges ou de tailles différentes sont associées à des substitutions couplées et/ou à la création de lacunes dans la structure pour compenser les modifications des charges électrostatiques. En prenant en compte à la fois les substitutions en CO_3^{2-} et en HPO_4^{2-} et les lacunes crées sur les sites du Ca^{2+} ou de l'OH^- (Rey et al., 2007), les apatites biologiques ont pour formule chimique générale :

$$Ca_{10-x+u}(PO_4)_{6-x-y}(HPO_4^{2-} \text{ ou } CO_3^{2-})_{x+y}(OH)_{2-x+2u+y}$$

où $0 \leq x \leq 2$ et $0 \leq 2u + y \leq x$

Les substitutions perturbent par conséquent l'équilibre stœchiométrique, mais également l'arrangement structural atomique et les paramètres de maille du cristal apatitique et altèrent donc la cristallinité.

La composition chimique des apatites osseuses dépend également de l'état de maturation après la phase initiale des dépôts de minéralisation sur la matrice collagénique. Le cristal apatitique sera composé de trois couches organisées du centre vers la périphérie : le cœur apatitique, la couche hydratée labile non apatitique, et la fraction aqueuse environnante (Figure 6). Au cours de la maturation, la couche hydratée va fournir les ions nécessaires à la croissance et la maturation des cristaux apatitiques (HPO_4^{2-}, PO_4^{3-} et CO_3^{2-}) et régresser en faveur de leur expansion (Cazalbou et al., 2004). De plus, la couche hydratée va servir de zone d'échange avec les ions environnants de la fraction

aqueuse. Au cours de la maturation, les ions HPO_4^{2-} de la couche hydratée seront remplacés par les ions CO_3^{2-} (Rey et al., 2009), qui progressivement pourront à leur tour se substituer au sein de la maille apatitique (Cazalbou et al., 2004).

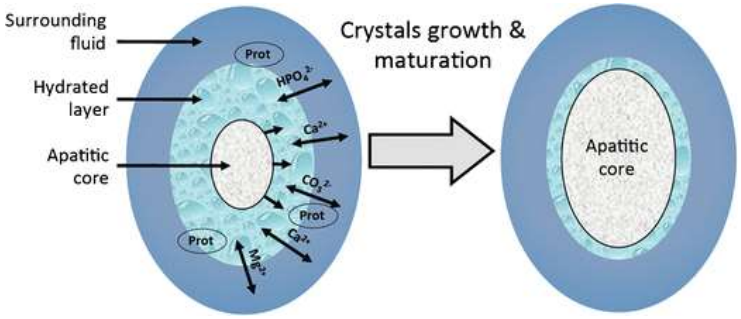

Figure 6 : Maturation des apatites biologiques (Bala et al., 2012)

La maturité minérale reflète ainsi la conversion des précurseurs non-apatitiques de la couche hydratée en substance minéralisée apatitique. En particulier, l'évaluation de la teneur en HPO_4^{2-} pourra être un bon indicateur de la maturité minérale (Rey et al., 2009).

De plus, le taux CO_3^{2-} peut être un indicateur de l'âge tissulaire. Le taux global de CO_3^{2-} (substitué à la maille et labile) diminuerait avec l'âge du cristal (Paschalis et al., 1996; Gourion-Arsiquaud et al., 2009), alors que le taux de substitution de type B en CO_3^{2-} augmenterait avec l'âge du cristal (Akkus et al., 2003; Yerramshetty et al., 2006). Le taux de substitution de type B en CO_3^{2-} semble également décliner avec un fort taux de remodelage (Isaksson et al., 2010).

Enfin, la taille et la perfection des cristaux apatitiques augmentent également généralement avec l'âge du sujet (Hanschin and Stern, 1995) et l'âge du cristal (Kazanci et al., 2006; Gourion-Arsiquaud et al., 2009). La largeur des cristaux apatitiques ont par contre tendance à diminuer du fait de la structure fibrillaire environnante qui régule l'expansion cristalline (Hanschin and Stern, 1995; Boskey A, 2003).

1.1.3 Qualité osseuse

Les propriétés mécaniques du tissu osseux dépendent de variables à la fois quantitatives (masse ou densité osseuse) et qualitatives. La qualité osseuse réfère à l'ensemble des caractéristiques liées à l'architecture et à la composition du tissu osseux qui déterminent ses propriétés tissulaires et sa capacité à effectuer ses fonctions mécaniques (Morris and Mandair, 2011).

Chaque niveau d'organisation du tissu osseux (de la macrostructure à la nanostructure) va influencer le niveau d'organisation supérieur. La notion de qualité osseuse peut donc s'évaluer à différente échelle (Figure 7).

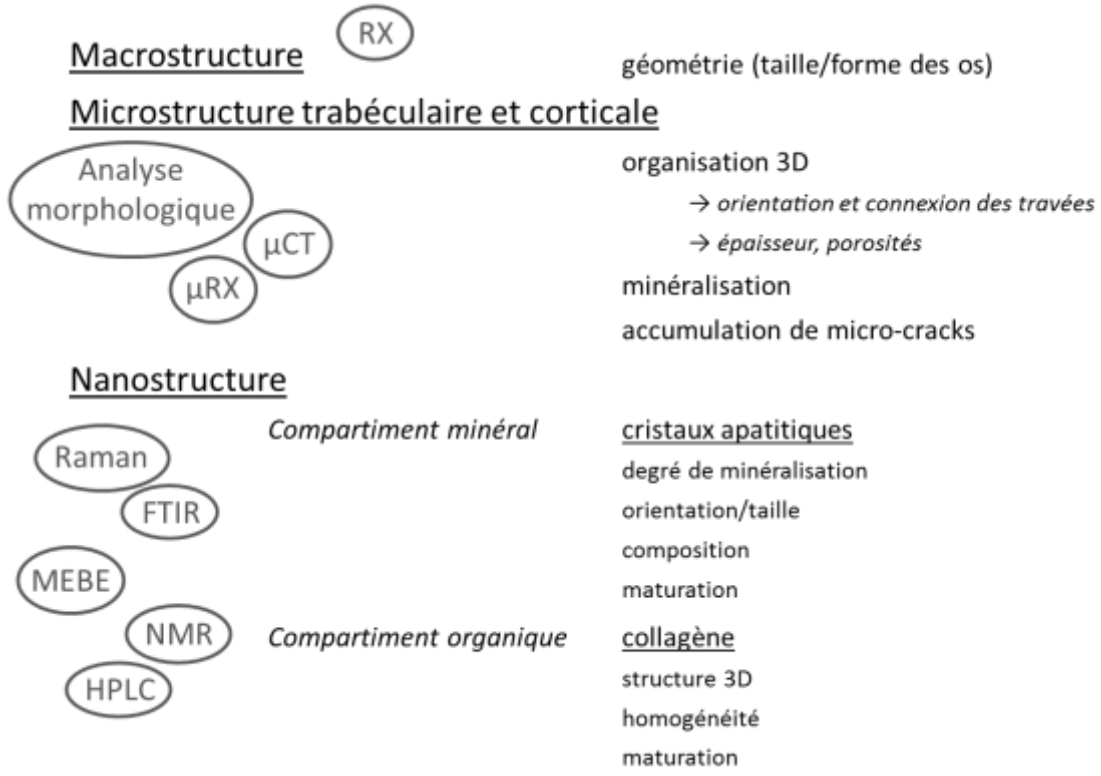

Figure 7 : Les différentes échelles d'évaluation de la qualité osseuse et les principales méthodes d'analyse associées (adapté d'après (Benhamou, 2007). RX : radiographie ; µCT : microtomographie assistée par ordinateur ; µRX : microradiographie quantitative ; FTIR : spectrométrie infrarouge par transformée de Fourier ; MEBE : microscopie électronique à balayage environnemental ; NMR : spectrométrie par résonnance magnétique ; HPLC : chromatographie liquide à haute pression

Dans le cadre de ce travail, nous considérons la qualité osseuse à l'échelle de la nanostructure (déterminants moléculaires et élémentaires).

Un des paramètres majeurs des propriétés mécaniques du tissu osseux est la minéralisation (Bala et al., 2012; Follet et al., 2004). D'un point de vue de la nanostucture, le **degré de minéralisation** est déterminé par la progression de la minéralisation le long de la matrice collagénique jusqu'à l'occupation de l'ensemble de l'espace disponible entre les fibrilles de collagène (Buckwalter et al., 1996). La présence des différentes protéines non collagéniques peut être un indicateur indirect des phénomènes d'initiation ou d'inhibition de la minéralisation. La minéralisation secondaire est ensuite influencée par l'âge tissulaire et le remodelage osseux.

Les autres paramètres liés au compartiment minéral sont également à prendre en considération. Au cours de la minéralisation, la taille et la perfection de l'arrangement des cristaux apatitiques (**cristallinité**) augmentent. La cristallinité est un élément important dans les propriétés mécaniques du tissu osseux (Yerramshetty and Akkus, 2008). Les variations de la composition de la maille cristalline sont également importantes. Les substituants de la maille cristalline, par exemple les **substitutions en CO_3** ou **en HPO_4** vont provoquer des changements structuraux du cristal apatitique (vacances, forme et symétrie) et influencer la cristallinité. De plus, l'organisation des fibrilles de collagène influence la taille et l'orientation des cristaux donc peut faire varier la cristallinité (Boskey A, 2003). Par conséquent, les variables relatives à l'**hydroxylation des prolines** et l'**établissement de liaisons croisées matures**, influençant l'organisation et la stabilité des fibrilles de collagène, sont à prendre en compte pour l'évaluation du compartiment organique et de manière conjointe à la cristallinité, dans l'évaluation de la qualité osseuse.

1.2 Incidence des bisphosphonates sur la qualité osseuse

Les bisphosphonates (BP) sont des médicaments utilisés depuis plusieurs années dans le traitement de nombreuses pathologies osseuses bénignes (ostéoporose) et malignes (myélome, métastases osseuses). Ils ont une action inhibitrice sur le remodelage et la résorption osseuse et permettent d'augmenter la masse et la densité de minéralisation osseuse. Les différences d'affinité pour la matrice minérale (séquestration au sein de l'os) et de mode d'action (voies cellulaires anti-ostéoclastiques) expliquent les variations de l'efficacité clinique (Russell et al., 2008).

1.2.1 Structure moléculaire des bisphosphonates

D'un point de vue chimique, les BP sont des analogues structuraux des pyrophosphates inorganiques naturels (PPi) caractérisés par une chaine P-O-P et qui inhibent la dissolution des apatites (Fleisch et al., 1966).

Les BP possèdent une chaîne commune P-C-P à laquelle sont liés de manière covalente des radicaux R1 et R2 au carbone central (Figure 8).

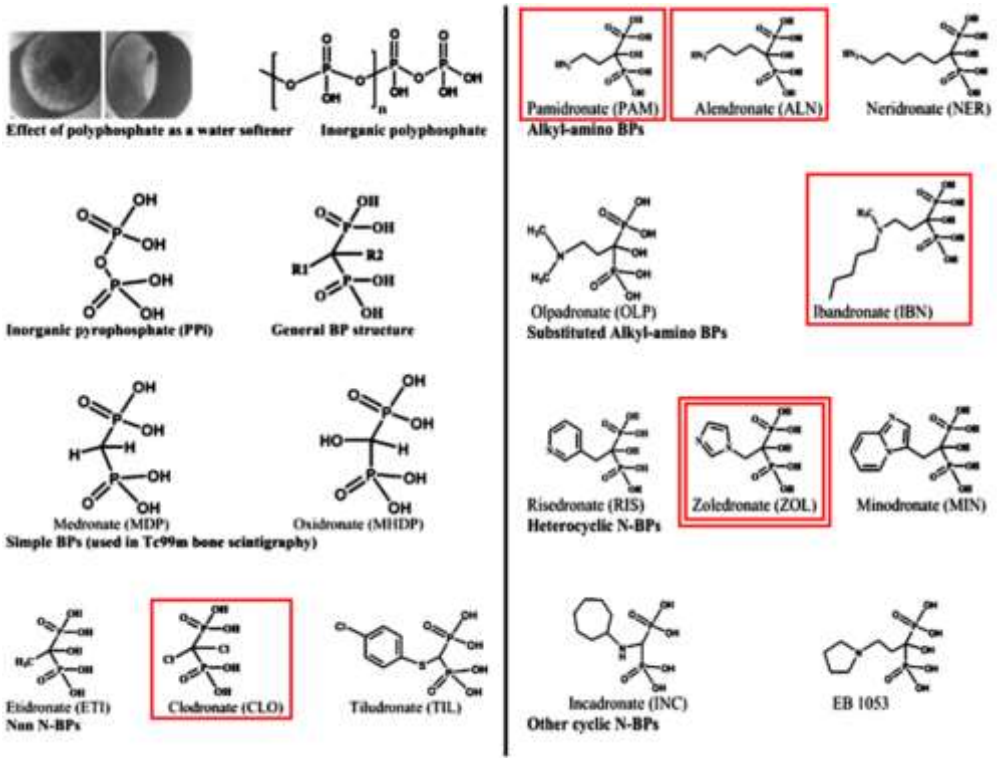

Figure 8 : Les différentes molécules de BP et leurs formules chimiques. Sont illustrés avec un cadre rouge les BP rencontrés dans notre travail et avec un double cadre rouge l'acide zoléronique Zol, BP testé dans notre modèle animal (adapté d'après (Russell, 2011)).

La nature moléculaire de ces radicaux détermine la classe de BP. En effet, on distingue selon la présence d'un atome d'azote en R2, les amino-BP des non amino-BP. De plus selon la conformation, les amino-BP sont classés en alkyl-amino BP (pamidronate, Pam, alendronate, aln et ibandronate, Ibn) ou en amino-BP hérérocycliques (acide zolédronique, Zol).

1.2.2 Liaison / interaction des bisphosphonates à la maille apatitique

1.2.2.1 Mécanismes de liaison / interaction

Les possibilités de fixation de ces molécules et de leur analogues structuraux PPi à l'HAP et l'inhibition de la croissance cristalline et de la dissolution ont été très tôt démontrées (Fleisch et al., 1966; Russell et al., 1970). Les études sur les mécanismes de liaison des BP s'accordent sur un phénomène de chimisorption avec un rôle prépondérant de la chaîne centrale P–C–P commune (van Beek et al., 1998). Cette structure présente une forte affinité pour le cristal apatitique, et ce notamment par l'intermédiaire des groupements phosphates qui lient de manière bidentée un atome de calcium du cristal.

La variabilité d'adsorption des différents BP est dépendante du type de groupements des radicaux R1 et R2 liés au carbone central (Figure 9).

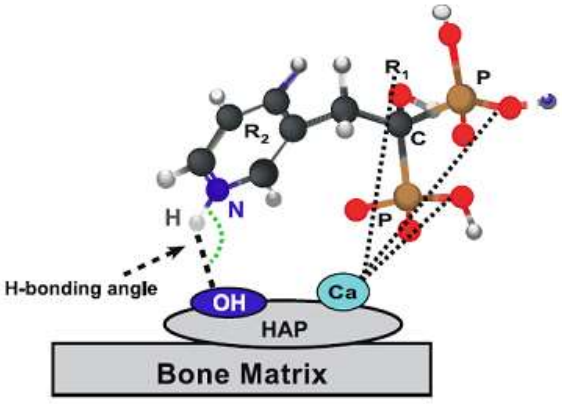

Figure 9 : Modélisation de la liaison/interaction des BP à l'HAP. La présence d'un groupe OH en R1 permet la liaison tridentée au Ca^{2+}, tandis qu'un atome d'azote permettrait la formation d'une liaison N-H-O avec le groupement hydroxyle (d'après (Russell et al., 2008).

Tout d'abord la présence d'un groupement OH en R1 augmenterait la liaison aux ions calcium du cristal apatitique (CaI) en permettant une liaison tridentée au calcium (Russell et al., 2008). De plus, en fonction de la nature de la chaine latérale R2 (présence d'atome d'azote), de sa position et de la conformation, la liaison/interaction des BP serait

variable. La présence d'un atome d'azote couplé à un encombrement stérique optimal (angulation ≥ 120°, distance N–O ≈ 3Å) permettrait l'établissement d'une liaison électrostatique N–H–O avec les ions OH^- (bordés par les CaII) de la maille apatitique (Russell et al., 2008).

Cette liaison est par exemple possible dans le cas de l'Aln (atome d'azote terminal), mais impossible dans celui de l'Ibn (atome d'azote inclus dans une longue chaîne R2). Dans le cas spécifique du Zol (atome d'azote au sein d'un hétérocycle), une liaison hydrogène supplémentaire avec un calcium voisin (CaI) pourrait également survenir et renforcer la liaison au cristal apatitique (Ebetino et al., 2005; Russell et al., 2008). Ces différences de conformation pourraient expliquer les différences d'affinité observées entre BP.

De plus, selon la charge électrique au niveau de l'atome d'azote de la chaine R2, la liaison des BP au cristal apatitique va entrainer une modification de la charge de surface, ou potentiel zêta, du cristal. Un changement de la charge à la surface des cristaux pourrait alors influencer la fixation d'autres molécules chargées. Par exemple, un BP chargé très positivement (comme le Zol) transfèrerait sa charge positive au cristal apatitique, ce qui faciliterait la liaison d'autres molécules de BP notamment par les groupes phosphate chargés négativement. L'accumulation des BP serait alors favorisée et la capacité de liaison sur le site apatitique serait maximisée (Russell et al., 2008). De plus ces modifications de charge au niveau du cristal apatitique pourraient entrainer des répercussions biologiques aussi bien sur la croissance et la structure cristalline, mais aussi sur l'environnement organique local (Russell et al., 2008).

Sur la base d'études *in vitro*, des modélisations ont également été proposées pour illustrer les mécanismes de liaison entre BP et apatites. La possibilité d'interactions électrostatiques entre deux atomes d'oxygène déprotonés du BP avec un atome de calcium de l'HAP a été envisagée avec des analogues structuraux du Pam (Chen et al., 2012a). De manière intéressante, ces interactions sont corrélées avec l'efficacité antirésorptive des molécules testées et dépendent également des variations au niveau du radical R2 et la distance entre HAP et BP. D'autres études sur des microsphères de phosphate de calcium avec l'Aln (Kim et al., 2010) ou des nanoparticules d'HAP avec le Til (Pascaud et al., 2013) envisage également l'incorporation du BP à leur composés synthétiques par cette association O-Ca.

Une substitution d'un ou plusieurs phosphates apatitiques par les groupements phosphates du BP a également été évoquée. Un modèle de substitution d'apatite stœchiométrique a été proposé dans le cas du Pam (Mukherjee et al., 2008) avec échange d'un groupement phosphate de la matrice minérale par au moins un des groupements phosphate du Pam. Cette substitution s'opérerait en deux temps et repose sur l'arrangement tétraédrique entre les deux phosphates du BP et un phosphate du cristal apatitique :

- déplacement du phosphate apatitique par un des phosphates du BP,
- puis interaction électrostatique du groupement azoté en R2 avec les deux phosphates restant du tétraèdre et interaction simultanée du groupement hydroxyl avec l'atome de calcium voisin.

La conformation spécifique du Pam permettrait donc à la fois la substitution du phosphate et une interaction avec le calcium de la matrice osseuse. Les études *in vitro* (Josse et al., 2005; Juillard et al., 2010; Mukherjee et al., 2008) ont confirmé cette hypothèse de substitution du phosphate au sein de la maille cristalline par le relargage d'un PO_3 inorganique et les modifications de l'arrangement cristallin apatitique.

1.2.2.2 Affinités des bisphosphonates

Le degré d'affinité variable de ces molécules pour la matrice minérale osseuse va influencer l'efficacité et la rémanence de leur action.

Des travaux *in vitro* (Leu et al., 2006; Nancollas et al., 2006) ont comparé les différents types de BP en fonction de leur affinité et ont établi une gradation selon laquelle le Zol aurait l'affinité la plus importante. Cependant d'autres études (Ironside et al., 2010; Jahnke and Henry, 2010; Mukherjee et al., 2008) semblent retrouver des variations dans cette classification (Tableau 2). Les amino-BP avec hétérocycle ne semblent pas avoir d'affinité supérieure si on les teste avec de la poudre d'os au lieu des modèles apatitiques synthétiques.

Les mécanismes exacts de liaison/interaction au sein de la maille apatitique dans les conditions biologiques *in vivo* restent à ce jour à élucider. Ces mécanismes d'une grande importance influencent la fixation et la séquestration des BP au sein de l'os et expliquent en partie les variations d'efficacité clinique observées selon la molécule.

Tableau 2 : Gradation *in vitro* selon le degré d'affinité des différents BP.

Etude	Matériaux testés	Méthodes d'évaluation	Gradation obtenue
(Nancollas et al., 2006)	HAP	Croissance cristalline	Zol > Aln > Ibn > Ris > Eti > Clo
(Leu et al., 2006)	Poudre os (Homme)	Adsorption compétitive	Zol ≈ Aln ≈ Ibn ≈ Ris ≈ Eti ≈ Pam > Til >> Clo
(Henneman et al., 2008)	HAP, CAP (3-7,9 %)	Dissolution cristalline	Zol > Aln > Ris
(Mukherjee et al., 2008)	Poudre os (Homme)	NMR Adsorption compétitive	Pam > Aln > Zol >Ris > Ibn
(Jahnke and Henry, 2010)	HAP Poudre os	NMR Adsorption compétitive	Pam ≈ Aln > Zol >Ris > Ibn Zol >> déoxy-Zol
(Ironside et al., 2010)	Poudre os (cheval)	NMR	Pam > Aln > Ner > Zol > Til
(Lawson et al., 2010)	HAP	Chromatographie Rétention sur colonne	Zol > Ris

HAP : hydroxyapatite ; CAP : apatite carbonatée ; NMR : spectrométrie par résonnance magnétique ; Zol : acide zolédronique ; Aln : alendronate ; Ibn, ibandronate ; Ris : risedronate ; Eti : étidronate ; Clo : clodronate ; Pam : pamidronate ; Til : tiludronate ; Ner : néridronate

1.2.3 Action antirésorptive des bisphosphonates

1.2.3.1 Mécanismes d'action

La variabilité d'efficacité à inhiber la résorption osseuse des différents BP est dépendante du type de groupements du radical R2 (Russell et al., 2008). Selon la présence et la position de l'atome d'azote, l'efficacité et les voies d'inactivation cellulaire seront différentes.

Tout d'abord, il existe une différence d'action anti-ostéoclasique entre non-amino-BP et amino-BP. Dans le cas des non-amino-BP, ils sont responsables de la formation d'analogues structuraux de l'ATP toxiques pour les ostéoclastes. Ce composé non métabolisable va s'accumuler dans la cellule, interférer avec le métabolisme normal, et provoquer l'apoptose. Dans le cas des amino-BP, ils vont d'abord interférer dans la voie du mévalonate impliquée dans la synthèse du cholestérol en se fixant sur un composé enzymatique, la farnésyl pyrophosphate synthétase (FPPS), et en l'inactivant de façon irréversible. L'inactivation de la FPPS va inhiber la prénylation et la maturation des protéines G, et va bloquer la régulation de processus métaboliques impliqués dans la fonction et la survie des ostéoclastes. D'autre part, l'inhibition de ce composé peut

secondairement conduire à la formation d'un analogue structural de l'ATP provoquant l'apoptose ostéoclasique (Rogers et al., 2011).

D'autre part, selon la position de l'atome d'azote du groupement R2 des amino-BP, la fixation des BP au FPPS va varier et influencer l'efficacité antirésorptive. La distance N–O joue encore un rôle primordial, avec comme décrit précédemment pour la liaison/interaction au cristal apatitique, une distance optimale de 3 Å (Kavanagh et al., 2006; Rondeau et al., 2006). Ainsi, un atome d'azote au sein d'un hétérocycle (Zol), en position terminale (Pam et Aln) ou inclus dans la chaine R2 (Ibn) augmente proportionnellement le potentiel antirésorptif par rapport aux non amino-BP. Et dans le cas d'un atome d'azote au sein d'un hétérocycle en R2 (Zol), l'efficacité serait supérieure (Ebetino et al., 2011).

1.2.3.2 Conséquences sur la maturation tissulaire

Par leur action anti-ostéoclasique, les BP agissent sur le remodelage osseux et son ralentissement. A long terme, ils permettent d'obtenir un gain quantitatif de la densité minérale (Chavassieux et al., 1997), une augmentation du degré de minéralisation (Boivin et al., 2000) et une homogénéisation des composants organiques et minéraux (Boivin and Meunier, 2002; Roschger et al., 2001; Donnelly et al., 2012; Misof et al., 2014). Ces effets peuvent s'expliquer par une maturité tissulaire plus importante due aux mécanismes de minéralisation secondaire et d'établissement de liaisons croisées matures du collagène.

De plus, le stockage de longue durée au sein du minéral osseux permettrait plusieurs mois après leur administration une redistribution de cette réserve *in situ* de BP lors de l'initiation d'une potentielle nouvelle résorption (Russell, 2011). Ces effets sur la maturation tissulaire seraient d'autant prolongés.

1.2.4 Modifications moléculaires du tissu osseux induites par les bisphosphonates

Dans des conditions biologiques (Tableau 3 et Tableau 4), les conséquences physicochimiques de l'incorporation des BP dans le tissu osseux ont été évoquées en prenant en compte une multitude de facteurs (modèle, molécule, durée de traitement, référentiel de comparaison…). De manière générale, les BP augmentent la minéralisation et la maturité collagénique de manière à compenser les effets délétères des maladies de

résorption excessive. Ces effets stabilisateurs ont été démontrés aussi bien pour les modèles animaux (Monier-Faugere et al., 1999; Bohic et al., 2000; Camacho et al., 2003; Otomo et al., 2004; Geoffroy et al., 2011; Burket et al., 2013) que chez l'Homme (Boivin et al., 2000; Roschger et al., 2001; Boskey et al., 2009; Bala et al., 2011). L'action des BP sur le remodelage permet donc la stabilisation de la maladie ostéoporotique chez l'Homme, et permet de rétablir un degré de minéralisation similaire à la normale (Roschger et al., 2010; Misof et al., 2013, 2014). De manière intéressante, quelques études chez l'animal indiquent une augmentation supérieure à la normale de la minéralisation et de la maturité collagénique (Allen et al., 2008; Saito et al., 2008; Gourion-Arsiquaud et al., 2010). Il n'existe à ce jour cependant aucune preuve que les BP pourraient induire chez l'Homme une minéralisation et/ou une maturation collagénique supérieure à une population saine non traitée.

D'autre part, des études envisagent la possibilité d'une action des BP indépendamment de leur action sur le remodelage osseux. Tout d'abord, une étude a mis en évidence *in vitro* une réorganisation de la maille cristalline des apatites suite à la liaison du Zol se traduisant par une diminution de la substitution en carbonates et une augmentation de la cristallinité (Juillard et al., 2010). Chez l'Homme, des études ont reportés des perturbations de la cristallinité qui pourraient être liées à cette incorporation des BP au sein de la maille apatitique (Y. Bala et al., 2012; Gamsjaeger et al., 2013, 2011b). Cependant, les conséquences moléculaires liées à la liaison/interaction des BP à la maille apatitique restent à ce jour mal connues.

Tableau 3 : Modifications moléculaires des BP dans les modèles animaux

Etude	Animal et secteur osseux	BP	Méthodes d'évaluation	Résultats
(Monier-Faugere et al., 1999)	Chienne OVX Tb et Ct (CI)	Ibn	FTIR	↗ minéralisation et ↗ cristallinité/maturité minérale *vs* placebo
(Bohic et al., 2000)	Rate OVX Tb (LV5)	Til	Raman FTIR NMR	Stabilise effets OVX : contenu minéral (PO_4, PO_4 et CO_3) similaire au CTL
(Camacho et al., 2003)	Souris OI Tb - Ct (fémur)	Aln	FTIR	↗ minéralisation (Tb) – cristallinité inchangée *vs* placebo
(Burr et al., 2003)	Chien Ct (côtes, CI)	Aln/Ris	MEBE FTIR	Absence de variation du contenu minéral
(Otomo et al., 2004)	Rats OVX Tb (LV5, fémur)	Ris	FTIR	↗ minéralisation *vs* placebo – CO_3 inchangé
(Allen et al., 2008)	Chien Tb (LV)	Aln/Ris (équivalent clinique)	HPLC	↗ liaisons croisées matures du collagène
(Saito et al., 2008)	Chien Ct (côtes)	Icn	ICP-AES HPLC	↗ contenu minéral ↗ liaisons croisées matures du collagène
(Gourion-Arsiquaud et al., 2010)	Chien Tb - Ct (tibia)	Aln/Ris	FTIR	↗ minéralisation et ↗ maturité collagénique
(Fuchs et al., 2011)	Lapin Tb (tête fémorale)	Ris/Aln	FTIR	Absence de variation du contenu minéral
(Geoffroy et al., 2011)	Souris OPNQ Tb (CauV) - Ct (fémur)	Ris (équivalent clinique)	FTIR	↗ maturité collagénique
(Calton et al., 2011)	Mouton OPNQ Tb (CI)	Aln	FTIR	Absence de variation du contenu minéral
(Portero-Muzy et al., 2012)	Mouton âgé Tb - Ct (LV1, CI)	Zol	HPLC	↗ liaisons croisées matures du collagène
(Burket et al., 2013)	Mouton OPNQ Tb (fémur)	Zol	Raman FTIR	↗ minéralisation, ↗CO_3, ↘ cristallinité *vs* placebo, similaire au CTL

OVX : ovariectomie; OI : ostéogénèse imparfaite ; OPNQ : ostéopénique ; Tb : trabéculaire ; Ct : cortical ; CI : crête iliaque ; LV : vertèbre lombaire ; CauV : vertèbre caudale ; FTIR : spectrométrie infrarouge par transformée de Fourier; NMR : spectrométrie par résonnance magnétique ; MEBE : microscopie électronique à balayage environnemental ; HPLC : chromatographie liquide à haute pression ; ICP-AES : Spectrométrie d'Emission Atomique par plasma à couplage inductif

Tableau 4 : Modifications moléculaires des BP chez l'Homme

Etude	Echantillon et secteur osseux	BP	Méthodes d'évaluation	Résultats
(Boivin et al., 2000)	Femme OP Tb - Ct (CI)	Aln 2 et 3 ans / Plc	µRX	↗ densité et homogénéité minérales (*vs* Plc)
(Roschger et al., 2001)	Femme OP Tb - Ct (CI)	Aln 3 et 5 ans / Plc	MEBE	↗ densité et homogénéité minérales (*vs* Plc)
(Zoehrer et al., 2006)	Femme OP Tb - Ct (CI)	Ris 3 et 5 ans / Plc	MEBE	↗ densité et homogénéité minérales (*vs* Plc)
(Durchschlag et al., 2006)	Femme OP Tb (CI)	Ris 3 et 5 ans / Plc	FTIR	↘ maturités collagénique et minérale/cristallinité (*vs* Plc – site formation osseuse à 3 ans)
(Boskey et al., 2009)	Femme OP Tb - Ct (CI)	Aln 3 ans / Plc	FTIR	↗ minéralisation (Ct) – Homogénéise cristallinité et maturité collagénique (*vs* Plc)
(Roschger et al., 2010)	Femme OP Tb - Ct (CI)	Aln 5 et 10 ans / valeur référence Tb	MEBE	Densité et homogénéité minérales similaires entre valeur réf /5/10ans
(Gamsjaeger et al., 2011b)	Femme OP Tb (CI)	Zol 3 ans / Plc	Raman	↗ minéralisation, ↘ taux de PG, ↘ cristallinité (*vs* Plc – âge tissulaire id)
(Bala et al., 2011)	Femme OP Tb - Ct (CI)	Aln 6,4 ± 2 ans / Plc	FTIR µRX	↗ minéralisation, ↘ cristallinité et ↗ maturité minérale (*vs* Plc)
(Bala et al., 2012)	Femme OP Ct (CI)	Aln 8 ± 2 ans / Plc	FTIR µRX	↘ cristallinité et ↗ maturité collagénique (*vs* Plc)
(Donnelly et al., 2012)	Femme OP Tb - Ct (fémur)	BP 7±5 ans / Plc	FTIR	Homogénéise cristallinité et maturité collagénique (Ct, *vs* Plc)
(Hofstetter et al., 2012)	Femme OP Tb (CI)	Aln et Ris 3-5 ans et > 5ans	Raman FTIR	Influence BP et dose sur : taux de PG, cristallinité et maturité collagénique (âge tissulaire id)
(Gamsjaeger et al., 2013)	Femme OP Tb (CI)	Zol 3 ans / Plc	Raman	↗ minéralisation, ↘ taux de PG, ↘ CO_3 et ↘ cristallinité (*vs* Plc – âge tissulaire id)
(Misof et al., 2013)	Femme OP Tb - Ct (CI)	Zol 3 ans / Plc/ valeur référence Tb	MEBE	Stabilise et homogénéise la minéralisation (Tb)
(Misof et al., 2014)	Homme OP Tb - Ct (CI)	Ibn 2 ans / T_0 / valeur référence Tb	MEBE	Stabilise et homogénéise la minéralisation (Tb)

OP : ostéoporotique, Tb : trabéculaire ; Ct : cortical ; CI : crête iliaque ; Plc : placebo ; µRX : microradiographie quantitative ; FTIR : spectrométrie infrarouge par transformée de Fourier ; MEBE : microscopie électronique à balayage environnemental PG : protéoglycanes

Chapitre 2. **Objectifs**

Dans le cadre général d'une meilleure compréhension des mécanismes d'action et de liaison/interaction des BP, ce travail se propose d'étudier les conséquences physicochimiques de leur incorporation au sein du tissu osseux. Pour cela, des échantillons animaux et cliniques ont été utilisés. Ces deux modèles représentent des situations de forte accumulation de BP et correspondent à deux situations physiopathologiques : la néoformation osseuse chez le rat et l'ostéonécrose des maxillaires liée aux BP chez l'Homme.

Le modèle de néoformation se base sur l'évaluation des variations de la qualité osseuse dans un modèle bien connu dans la littérature de cicatrisation de défaut critique (Chen et al., 2013; Nagata et al., 2009; Vigier et al., 2011). Au cours des phénomènes de la réparation osseuse, nous considérons que l'os néoformé pourra accumuler un taux important de BP du fait de la disponibilité des cristaux apatitiques en croissance sur lesquels peuvent se fixer les BP administrés (Roelofs et al., 2012). De plus, le choix du site au niveau du *calvarium* de rat présente l'avantage majeur de s'affranchir des diverses sollicitations mécaniques et des importants remaniements osseux associés qui pourrait interférer dans l'analyse et l'interprétation des résultats. Enfin, le design de notre étude permet de majorer les effets des BP sur l'os néoformé en évaluant le gain/perte relatif des différents paramètres physico-chimiques liés à la qualité osseuse. Notre hypothèse est que la composition et la structure des cristaux apatitiques seraient modifiées, indépendamment des effets des BP sur le remodelage et la maturation osseuse.

L'étude de séquestres d'ostéonécrose des maxillaires liée au BP concerne également un site de forte accumulation de BP. La distribution des BP est variable selon le site, avec une fixation préférentielle dans les sites osseux à fort remodelage comme les maxillaires (Cremers and Papapoulos, 2011). Il est estimé que la concentration de BP au niveau des maxillaires est cent fois plus élevée que celle d'autres sites osseux (Reid et al., 2007). Inversement, les conséquences de cette forte accumulation au niveau des maxillaires perturbent en retour le remodelage osseux physiologique des maxillaires (Allen et al., 2011, 2010; Huja et al., 2011). Ainsi, nous émettons l'hypothèse de modifications moléculaires de la qualité osseuse du fait, d'une part de la forte fixation/interaction des BP au tissu osseux maxillaire et, d'autre part à la maturation prolongée du tissu osseux.

Chapitre 3. **Matériels et méthodes**

3.1 Modèle de néoformation osseuse chez le rat

3.1.1 Animaux

Des rats mâles adultes âgés de 8 semaines (poids de 300 à 320 mg) sont utilisés pour nos essais. Les animaux sont hébergés à l'animalerie du Département Hospitalo-Universitaire de Recherche Expérimentale (DHURE) de la Faculté de médecine de Lille2 dans des conditions standards. Les animaux sont gardés dans des cages individuelles avec nourriture et eau à volonté.

Toutes les procédures sont conduites en conformité selon les directives 93/23/CEE et ont été approuvées par le département vétérinaire du ministère de l'agriculture (autorisation n°59-350137).

3.1.2 Modèle chirurgical

Après quatre jours d'acclimatation, la chirurgie du défaut osseux (Figure 10) est réalisée sous anesthésie générale par injection en intra-péritonéale (IP) de kétamine (50 mg/kg, Imalgen®) et de xylasin (5 mg/kg, Rompun®). En complément, une injection de carprofen (15 mg/kg, Rimaldyl®) est réalisée en IP pour le contrôle post-opératoire de la douleur.

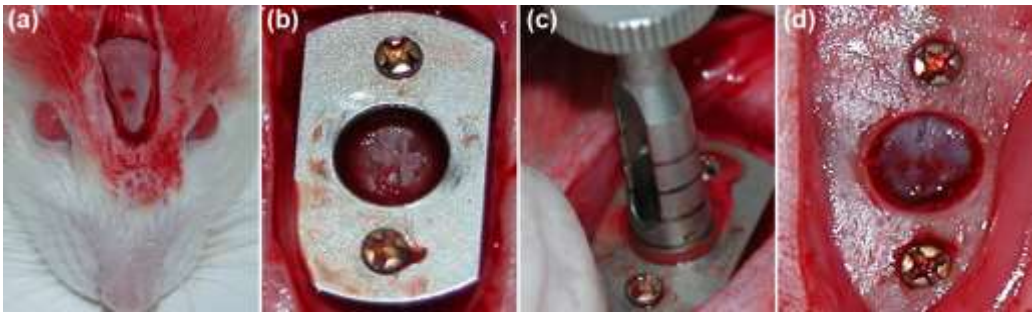

Figure 10 : Les différentes étapes chirurgicales de réalisation du défaut osseux : (a) site osseux situé sur la suture sagittale du *calvarium* de rat ; (b) positionnement de la pièce métallique préformée, (c) réalisation du défaut osseux de 4 mm ; et (d) repérage ultérieur du défaut osseux possible grâce aux mini-vis laissées en place.

La tête du rat est ensuite rasée et désinfectée à l'aide d'une solution iodée (Bétadine®). Une incision semi-lunaire des plans cutanés, musculaire et du périoste est effectuée au niveau du *calvarium* permettant la résection des tissus mous vers l'arrière et l'accès au site osseux.

Une pièce métallique préformée préalablement réalisée (Bruno Buys, atelier de mécanique, INSERM U703) est utilisée pour faciliter la standardisation et le repérage des limites du défaut osseux. Celle-ci est placée sur le site osseux, centrée sur la suture sagittale, et fixée à l'aide de deux mini-vis (0.9 × 1.3 mm Modus®, Mediartis S.A.R.L., Vaulx Milieu, France). Un défaut osseux de 4 mm est réalisé avec un trépan (Stoma®, Emmingen-Liptingen, Germany) monté sur micromoteur à basse vitesse de rotation et sous irrigation constante. La pièce préformée est ensuite déposée et les mini-vis sont laissées sur le site afin de permettre le repérage ultérieur après la cicatrisation osseuse des limites du défaut osseux initial. Les tissus mous sont repositionnés et ensuite suturés (Vicryl® 4-0).

Les suites de la chirurgie sont simples, tous les animaux présentent une activité normale et une prise de poids constante.

3.1.3 Modalités d'injection

L'acide zolédronique (2-(imidazole-1-yl)-hydroxy-ethylidene-1,1-bisphosphonic acid, disodium salt, 4,75 hydrate) est fourni par Novartis Pharma (Basel, Switzerland). La poudre est dissoute dans une solution saline (0.9 % NaCl) et diluée à la concentration souhaitée.

Deux semaine après la chirurgie, les animaux sont répartis aléatoirement dans les groupes test (Zol) ou contrôle (CTL) et reçoivent respectivement des doses sous-cutanées de Zol ou de solution saline selon un même schéma posologique (Figure 11).

Trois modalités d'injection de Zol sont testées :

- groupe ZA-S120 (n = 10) : injection unique de 120 µg/kg, dose équivalente à un an de traitement de l'ostéoporose (Biver et al., 2010) ;
- groupe ZA-M120 (n = 15) : injection quotidienne de 20 µg/kg pendant 6 jours, dose fractionnée équivalente à un an de traitement de l'ostéoporose ;
- groupe ZA-M600 (n = 15) : injection hebdomadaire de 100 µg/kg pendant 6 semaines, dose équivalente à 6 mois de traitement pour l'ostéolyse maligne (Heymann et al., 2005; Yamashita et al., 2011).

Le même nombre d'animaux traités par solution saline constitue les groupes respectifs CTL-S120, CTL-M120 et CTL-M600.

Pour identifier l'os néoformé durant les injections multiples, les animaux reçoivent en complément des injections de cyclines. La calcéine et la déméclocycline (30mg/kg, Sigma-Aldrich®, Saint-Quentin Fallavier, France) sont administrées en IP 15 jours et la veille du sacrifice (Figure 10).

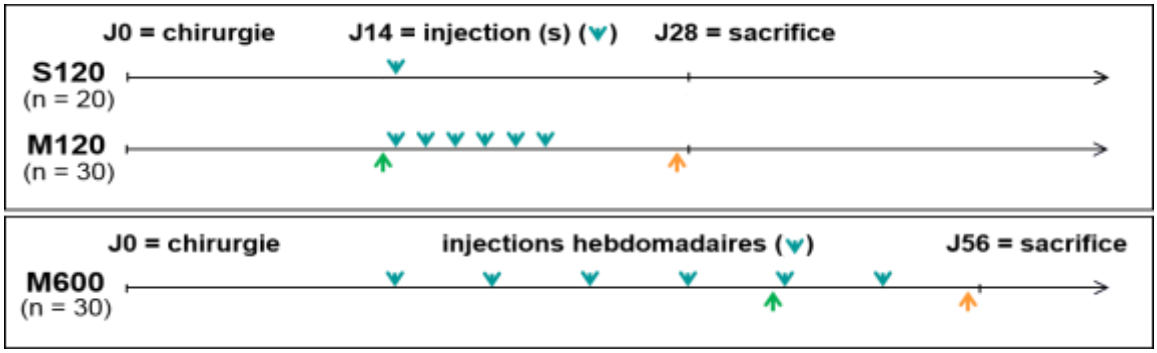

Figure 11 : Protocole d'administration correspondant aux injections unique (S) ou multiples (M). Pour chaque série, les rats reçoivent du ZA ou du sérum en fonction du groupe. Les injections de calcéine et de déméclocycline correspondent respectivement aux flèches verte et orange.

3.1.4 Préparation des échantillons

Les animaux sont euthanasiés 4 semaines (groupes S120 et M120) ou 8 semaines (M600) après la chirurgie du défaut osseux. Les *calvaria* entiers sont prélevés et fixés 48h dans une solution d'éthanol à 70 %. Les échantillons sont ensuite imprégnés dans trois bains successifs de poly-méthyl méthacrylate (PMMA) avant l'inclusion dans la résine PMMA (solution PMMA avec le mélange initiateur).

L'axe de coupe est déterminé dans l'axe longitudinal de la pièce osseuse selon les repères laissés par les mini-vis (Figure 12).

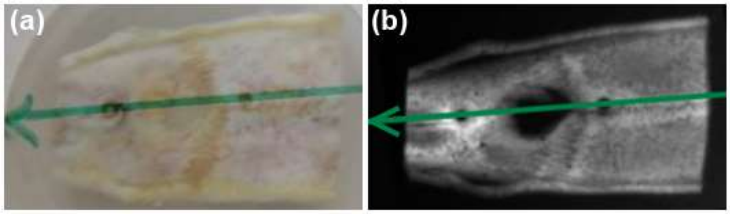

Figure 12 : Repérage macroscopique de la zone du défaut osseux cicatrisé : (a) sur l'échantillon inclus et (b) pour illustration sur la même zone radiographiée. La position des mini-vis permet de déterminer l'axe de coupe au centre du défaut osseux cicatrisé.

Des coupes fines sont réalisées et polies progressivement avec des suspensions de carbures de silicium et de diamant pour atteindre une épaisseur de 100 µm (Sylvie

Regnier, laboratoire des Processus et Bilans des Domaines Sédimentaires, UMR CNRS 8110, USTL).

3.1.5 Choix des zones d'analyses

Le repérage des zones marquées par les cyclines est effectué par microscope confocal à fluorescence Zeiss LSM710 (Carl Zeiss, France) associé au logiciel Zen 2009. Le microscope est équipé d'un objectif Apochromat (× 40, ON = 1.2), d'un laser Argon multi-raies et des filtres chromatiques adéquats. Les fluorochromes sont individualisés selon leur longueur d'onde : la calcéine à 488 nm et la déméclocycline à 514 nm (Pautke et al., 2005, 2010).

Pour chaque échantillon, l'acquisition de la totalité de la section osseuse est réalisée pour identifier l'os néoformé dans la zone du défaut osseux cicatrisé et l'os à distance du défaut osseux (Figure 13).

Images en microscopie à fluorescence **Images MEBE**

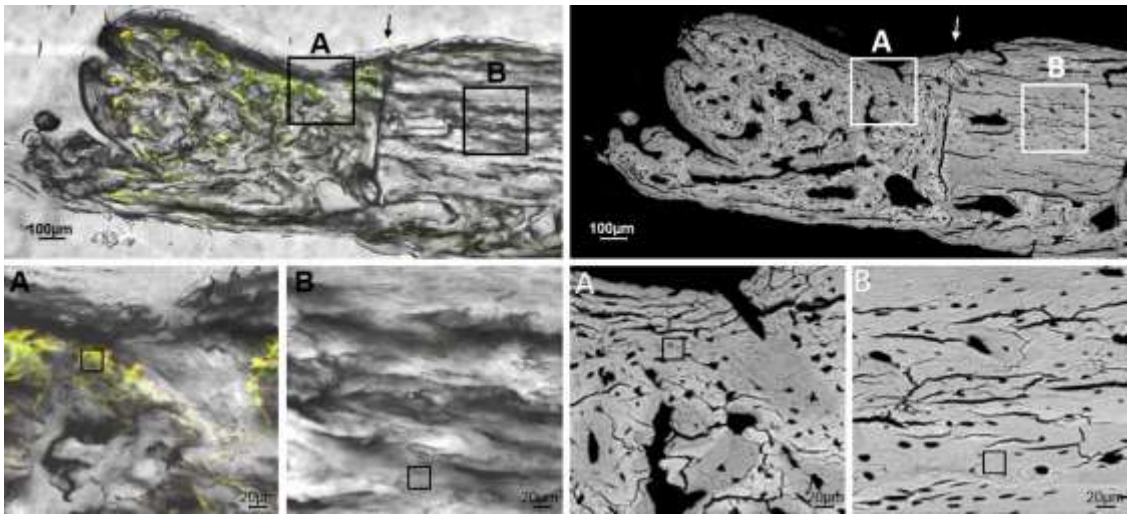

Figure 13 : Sélection de régions d'intérêt au niveau de l'os néoformé et l'os distant. La délimitation du défaut osseux initial est signifiée par une flèche sur les photos supérieures. Pour illustrer le choix et la transposition des régions d'intérêt restreintes, deux zones larges (A) et (B) sont sélectionnées respectivement au niveau de l'os néoformé et de l'os à distance (photos inférieures). A gauche, le marquage fluorescent aux cyclines permet l'identification des zones marquées de l'os néoformé et des zones non marquées de l'os à distance. Dans ces zones (A) et (B), un carré d'analyse de 25 × 25 µm correspondant à une région d'intérêt restreinte est défini (carré noir des images (A) et (B)). A droite, les images réalisées aux MEBE illustrent la transposition de cette région d'intérêt. Les mesures MEBE et Raman sont réalisées dans les mêmes régions d'intérêt préalablement définies.

Dans la zone du défaut osseux, les zones d'intérêt larges sont sélectionnées à l'aide du marquage fluorescent aux cyclines correspondant à l'os néoformé durant les injections de ZA ou de solution saline. Dans ces zones sont définies trois régions d'intérêt restreintes de 25 × 25 µm.

Dans les zones osseuses à distance, le marquage fluorescent est peu visible indiquant un remodelage osseux faible. Les zones d'intérêt larges dépourvues de marquage fluorescent sont sélectionnées pour comparaison dans notre étude. Dans ces zones d'intérêt sont définies trois régions d'intérêt restreintes de 25 × 25 µm.

Pour chaque échantillon, les analyses par microscopie électronique à balayage environnemental (MEBE) et par microspectroscopie Raman sont réalisées aux mêmes endroits grâce à la transposition de ces régions d'intérêt restreintes.

3.1.6 Détermination du gain/perte relatif lié à la néoformation osseuse

Préalablement, nous avons effectué nos mesures MEBE et Raman au niveau de l'os néoformé situé dans la zone de défaut osseux cicatrisé et au niveau de l'os distant. Les différents paramètres MEBE et Raman sont calculés pour chaque zone d'analyse, puis moyennés par animal. Ces valeurs brutes sont reprises dans l'annexe A1.

A partir de ces moyennes, nous avons déterminé pour chaque animal le gain/perte relatif lié à la néoformation osseuse de chaque paramètre. Ce traitement nous a permis d'évaluer plus précisément les effets du Zol sur le processus de néoformation osseuse et de s'affranchir des variations individuelles.

Pour chaque animal, nous avons déterminé la valeur moyenne du paramètre de l'os néoformé et nous l'avons pondéré par la valeur moyenne du même paramètre de l'os à distance (valeur de référence propre à l'animal). Le gain/perte relative d'un paramètre correspond donc à la formule :

$$x' = \frac{\text{MOYENNE defect} - \text{MOYENNE distance}}{\text{MOYENNE distance}}$$

Cette valeur moyenne correspond à un gain ou une perte de x' fois la valeur brute à distance.

3.2 Etude d'échantillons cliniques issus de l'ostéonécrose des maxillaires liée aux bisphosphonates

3.2.1 Séquestres osseux d'ostéonécrose des maxillaires liée aux bisphosphonates

Le groupe test (groupe BP, n = 24, 68 ± 14 ans) est constitué de séquestres osseux mandibulaires issus de patients souffrant d'ostéonécrose des maxillaires induite par les BP (ONM). Ces échantillons sont collectés lors de la consultation pluridisciplinaire du CHR de Lille spécialisée dans le suivi des patients sous traitement par BP (Vieillard et al., 2008). Un séquestre osseux est défini comme un fragment d'os nécrotique séparé de l'os environnant et qui est spontanément expulsé et prélevé par procédure chirurgicale limitée (« chirurgie de propreté ») (Figure 14). Ces procédures sont réalisées en accord avec les patients et sont conformes à la réglementation.

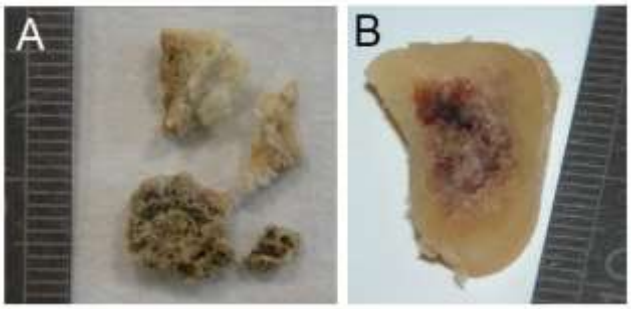

Figure 14 : Echantillons cliniques : (A) séquestres d'ONM et (B) pièce anatomique de mandibule

Dans notre étude, nous considérons que ces cas d'ONM connus comme une complication rare constituent un modèle de forte accumulation de BP. Nous avons distingué de ce fait, au sein du groupe BP, deux sous-groupes en fonction de la pathologie sous-jacente compte tenu des différences de modalités d'administration (molécules, dose cumulée, voie et rythme d'administration) entre les pathologies bénignes et malignes (Tableau 5).

- Le groupe bénin-BP (n = 8) est constitué des patients ostéoporotiques. Ils ont été traités par voie orale par alendronate seul ou combiné à l'ibandronate. La durée de traitement varie de 22 à 156 mois.
- Le groupe malin-BP (n = 16) est constitué de patients souffrant soit de myélome multiple soit de métastases osseuses. Ils ont été traités par voie IV par zolédronate et/ou pamidronate +/- clodronate. Les durées de traitement varient de 4 à 81 mois.

Tableau 5 : Caractéristiques des patients (sexe, âge et pathologies) et du traitement par BP (types de molécule, durée de traitement)

Sexe	Age	Pathologie	BP	Durée traitement (mois)
		Groupe bénin-BP[a]		
Femme	55	Ostéoporose	Aln [b]	22
Femme	71	Ostéoporose	Aln	24
Femme	74	Ostéoporose	Aln	24
Femme	55	Ostéoporose	Aln	60
Femme	87	Ostéoporose	Aln	96
Femme	88	Ostéoporose	Aln	96
Femme	81	Ostéoporose	Aln + Ibn	60 + 96[c]
Femme	81	Ostéoporose	Aln + Ibn	60 + 96
		Groupe malin-BP		
Homme	78	Myélome	Zol	12
Femme	50	Métastases	Zol	13
Femme	94	Métastases	Zol	15
Femme	72	Myélome	Zol	20
Femme	73	Myélome	Zol	20
Femme	75	Myélome	Zol	20
Femme	64	Métastases	Zol	26
Femme	42	Métastases	Zol + Clo	4 + 36
Femme	43	Métastases	Zol + Clo	4 + 36
Femme	64	Métastases	Zol + Clo	7 + 18
Femme	66	Métastases	Zol + Clo	11 + 10
Femme	45	Métastases	Zol + Clo	13 + 24
Femme	60	Métastases	Zol + Clo	24 + 18
Femme	65	Métastases	Pam	28
Femme	72	Myélome	Pam + Clo	48 + 8
Femme	82	Myélome	Pam+ Zol + Clo	61 + 13 + 7

[a] Le groupe BP est subdivisé en groups bénin-BP et malin-BP selon la pathologie pour laquelle les patients sont traités.

[b] Aln, Alendronate; Clo, Clodronate; Ibn, Ibandronate; Pam, Pamidronate; Zol, Zolédronate.

[c] Nombre de mois de traitement pour chaque molécule, c.à.d. 60 + 96 signifie que la patient est traité 60 mois avec l'alendronate puis 96 mois avec l'ibandronate.

3.2.2 Echantillons contrôles

Le groupe contrôle (groupe CTL, n = 24, 78 ± 11 ans) est constitué de sections transversales de pièces anatomiques de mandibules prélevées au laboratoire d'anatomie de la faculté de médecine de Lille2 (Figure 11). Le sexe ratio est de 13 femmes pour 11 hommes. Les sujets de ce groupe ne présentaient pas de pathologies osseuses évidentes.

3.2.3 Préparations des échantillons

Tous les échantillons sont préalablement fixés 48h dans une solution d'éthanol à 70 % (non inclus). Les séquestres sont ensuite sectionnés à cœur longitudinalement. La face de section est ensuite polie successivement avec des papiers abrasifs de granulométrie décroissante (30, 3, and 0.3 μm; Escil, Lyon, France).

3.2.4 Choix des zones d'analyse

Dans le cas des séquestres osseux, la distinction entre os cortical et os spongieux est difficile, le tissu osseux se caractérise par une apparence sclérotique et peu de travées (Marx et al., 2005; Vieillard et al., 2008). De plus, secondairement à la nécrose, une apposition d'os fibreux est également observée (Bedogni et al., 2008; Favia et al., 2009). Ainsi, pour le groupe BP, nous avons choisi d'effectuer nos analyses au niveau des ostéons résiduels en nous basant sur l'organisation lamellaire des zones osseuses (Figure 15).

Pour le groupe CTL, les analyses sont effectuées en comparaison au niveau des ostéons de l'os cortical à proximité du canal de Havers vers les lamelles externes.

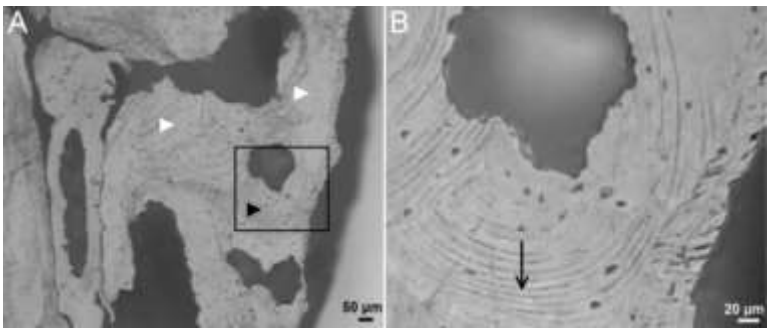

Figure 15 : Organisation microscopique d'un séquestre d'ONM avec (A) la distinction de l'os lamellaire (pointe de flèche noire) et de l'os fibreux (pointe de flèche blanche). Le carré représente une zone d'intérêt d'organisation lamellaire (B) où nous avons effectué nos mesures sur la ligne d'analyse (flèche noire).

Sur chaque échantillon, nous avons déterminé une ligne d'analyse de 50 µm transversalement aux structures lamellaires dans trois zones différentes. Les analyses par microspectrométrie Raman sont effectuées le long de ces lignes d'analyse.

3.3 Microscopie électronique à balayage environnementale

Cette technique n'a été utilisée que sur le modèle de néoformation osseuse chez le rat. Le volume et la forme des séquestres osseux d'ONM ne permettaient pas de standardiser la préparation des échantillons en coupes fines.

La microscopie électronique à balayage environnementale (MEBE) est une méthode d'analyse quantitative dont la résolution latérale est proche du micromètre. Les images électroniques en niveaux de gris sont obtenues soit à partir des électrons secondaires (SE), soit à partir des électrons rétrodiffusés (BSE). Ces images SE et BSE donnent respectivement des informations sur la topographie de surface et la composition élémentaire de l'échantillon. Le MEBE est couplé à un détecteur EDX qui permet de caractériser et de quantifier les éléments détectés selon leur masse élémentaire.

Dans le cadre de notre étude, les variations du contenu minéral et, plus particulièrement, la teneur en Ca^{2+} et sa répartition spatiale, sont quantifiées à partir des images BSE, selon la méthode décrite par Roschger (Roschger et al., 1998). La répartition spatiale du Ca^{2+} correspond au profil de distribution de la densité de minéralisation osseuse (Bone Mineralization Density Distribution, BMDD). Les différentes BMDD obtenues sont reliées à différentes situations physiopathologiques osseuses (Roschger et al., 2008).

3.3.1 Obtention du profil de distribution de densité de minéralisation osseuse

Les analyses MEBE sont réalisées avec l'aide de Philippe Recourt (laboratoire des Processus et Bilans des Domaines Sédimentaires, UMR CNRS 8110) sur un microscope électronique à balayage environnemental (MEBE, Quanta 200 FEI) couplé au détecteur de spectrométrie X par perte d'énergie (EDX, QuanTax Bruker). La calibration des niveaux de gris est obtenue à partir de mesures étalons de la résine PMMA, du fluoride de magnésium (MgF_2) et du phosphate tricalcique (β-TCP). Selon la méthode décrite par

Roschger (Roschger et al., 1998), la calibration est effectuée de manière à ce que les niveaux de gris du PMMA, du MgF_2 et du β-TCP soit égaux respectivement à 0, 150 et 255. Cette calibration permet d'ajuster la fenêtre de niveaux de gris de 0 à 255 avec une correspondance des taux de calcium de 0 % (PMMA) à 38,7 % (β-TCP) (Elliot, 1994). Les images digitales BSE de taille 512 × 512 pixels sont acquises en une seule fois. Le grossissement × 400 utilisé correspond à une résolution de 1µm/pixel.

Les images BSE sont ensuite traitées par le logiciel d'analyse d'images Aphélion® (ACDIS, Hérouville, France). L'analyse d'image permettra d'extraire l'histogramme des niveaux de gris qui correspond au nombre de pixels de l'image en fonction du niveau de gris. Grâce à la calibration, les niveaux de gris sont convertis en taux de calcium. Le nombre de pixels est normalisé de manière à ce que la somme de tous les pixels de niveau de gris supérieurs à 0 soit égale à 100 %. L'axe des ordonnés représente le pourcentage de surface osseuse.

La conversion de l'histogramme permet d'obtenir la BMDD (Figure 16).

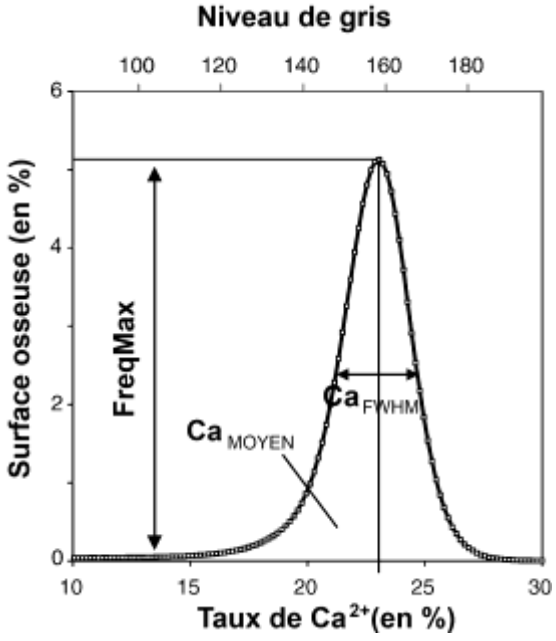

Figure 16 : Profil de distribution de la BMDD et les paramètres étudiés : le taux de Ca^{2+} est extrapolé à partir de la répartition des niveaux de gris par pourcentage de surface ; à partir de cette courbe, les trois paramètres d'intérêt Ca_{MOYEN}, MaxFreq et Ca_{FWHM} sont calculés comme illustré.

La distribution des niveaux de gris par pixel est proportionnel à la distribution des taux en Ca^{2+} par pourcentage de surface (Roschger et al., 1998).

3.3.2 Paramètres liés à la distribution de la densité de minéralisation osseuse

En complément du profil de BMDD lié à la pathologie ou au traitement, on peut déduire les paramètres relatifs à l'homogénéité et le degré de minéralisation (Roschger et al., 1998). Ces paramètres sont déterminés par trois variables (Figure 16) :

- **Ca_{MOYEN}** : taux moyen de Ca^{2+} de la surface osseuse
- **MaxFreq** : pourcentage maximum de la surface osseuse de même taux de Ca^{2+}
- **Ca_{FWHM}** : hétérogénéité de la distribution du taux de Ca^{2+}

Ces analyses sont effectuées avec le logiciel Matlab R2010a (Mathworks, Inc., Natick, MA, USA).

3.3.3 Choix des zones d'analyse

Les études précédentes ayant étudiées les variation du contenu calcique, ont pris en compte des régions d'intérêt larges (Zoehrer et al., 2006; Roschger et al., 2010; Misof et al., 2013, 2014). Ces études se sont intéressées à l'évaluation de la BMDD à l'échelle tissulaire. Or dans notre cas, il s'agit de se limiter aux zones osseuses néoformées repérées par le marquage aux cyclines. Nous avons donc évalué l'influence de la taille de la région d'intérêt dans les paramètres liés à la BMDD.

Des essais préliminaires sur la série M600 ont été réalisés. Ils ont évalués distinctement les paramètres soit sur trois régions d'intérêts larges de 2 × 2.5 mm (équivalentes aux analyses précédentes (Zoehrer et al., 2006; Roschger et al., 2010; Misof et al., 2013, 2014)), soit sur trois régions d'intérêt restreintes de 25 × 25 µm en correspondance avec les zones marquées par les cyclines pour la zone du défect (Figure 13). Ces régions d'intérêt sont comparées à des régions de mêmes surfaces disposées aléatoirement dans l'os distant non marqué (Figure 13). Le traitement d'images des régions d'intérêt larges et restreintes est effectué sous Aphélion® pour obtenir le profil de BMDD. Les paramètres calciques sont calculés à partir ces différents profils de la BMDD. L'ensemble de ces résultats est présentés dans l'annexe 2.

Les résultats obtenus montrent des différences significatives dans la zone du défect selon la taille de la région d'intérêt (voir annexe 2). L'objectif de ce travail étant de mettre en évidence les effets du Zol lors de la néoformation osseuse, nous avons retenu

l'analyse d'image par régions d'intérêt restreintes en nous guidant par le marquage fluorescent.

3.4 Microspectroscopie Raman

La microspectroscopie Raman est méthode d'analyse semi-quantitative ayant une résolution spatiale micrométrique. C'est une technique de spectroscopie vibrationnelle basée sur l'interaction lumière-matière. Lorsque que l'on éclaire un échantillon avec une lumière monochromatique, une partie de la lumière est diffusée avec un changement d'onde (effet Raman). Le spectre de diffusion Raman va comporter des bandes Raman dont le nombre et la position sont reliées aux vibrations des molécules composant l'échantillon. Les bandes Raman sont variables selon la distance et les forces interatomiques ou selon la conformation dans laquelle les atomes sont engagés (géométrie, symétrie). Le signal Raman est caractéristique de la nature de la molécule et permet d'évaluer la composition et la structure moléculaire d'un échantillon.

L'analyse Raman du tissu osseux permet l'évaluation de la composition et de la structure à la fois des compartiments organique et minéral (Carden and Morris, 2000; Kazanci et al., 2007; Morris and Mandair, 2011). L'analyse Raman permet de caractériser les modifications du tissu osseux dans des situations physiologiques comme le vieillissement (Akkus et al., 2003; Yerramshetty et al., 2006; Kazanci et al., 2006; Goodyear et al., 2009), ou pathologique comme l'ostéoporose (McCreadie et al., 2006; Shen et al., 2010) ou l'ostéonécrose (Lakshmi et al., 2003).

3.4.1 Acquisition des spectres Raman

Pour le modèle animal, les analyses Raman sont réalisées à l'aide d'un microspectromètre Labram HR800 (Horiba Gr, Jobin Yvon, Lille, France). Ce microspectromètre est équipé d'une diode laser (λ = 785 nm) et d'un microscope Olympus (BX 40, Olympus, France). Les spectres sont acquis avec un objectif x 100 (ON = 0,9). L'objectif permet de focaliser le faisceau laser et de collecter le signal Raman. Le spot d'analyse est proche de 1 µm. Le signal Raman est analysé par un spectromètre couplé à un détecteur CCD (1024 x 256 pixels) refroidi à l'air. La résolution spectrale est de l'ordre de 4 cm^{-1}. La fenêtre d'acquisition est comprise entre 300 et 1700 cm^{-1}. Le temps d'acquisition pour chaque spectre est de 1 min, correspondant à 2 accumulations de 30 s.

Pour chaque échantillon, une analyse ponctuelle est réalisée tous les 5 µm sur une surface de 25 × 25 µm. Cette analyse est répétée à 3 endroits différents. Chaque surface correspond à une région d'intérêt préalablement sélectionnées au niveau de l'os néoformé (n = 3) et de l'os distant (n = 3). Un total de 25 spectres est donc réalisé par région d'intérêt. Un total de 150 spectres est réalisé par échantillon, 75 au niveau de l'os néoformé et 75 au niveau de l'os distant.

Pour les échantillons cliniques d'ONM, les analyses Raman sont réalisées sur un microspectromètre OMARS 89 (Horiba Gr, Jobin Yvon, Lille, France). Le microspectromètre est équipé d'un laser monochromatique He-Ne (λ = 632 nm), détecteur CDD (1024 x 256 pixels) refroidi à l'air et microscope (Olympus, France) utilisé avec l'objectif ×100 (ON = 0.9). Le spot d'analyse est proche de 1 µm. La résolution spectrale est de l'ordre de 2 cm^{-1}. La fenêtre d'acquisition est comprise entre 900 et 1700 cm^{-1}. Le temps d'acquisition pour chaque spectre est de 10 min, correspondant à 10 accumulations de 60 s.

Pour chaque échantillon, une analyse ponctuelle est réalisée tous les 2 µm sur une ligne d'analyse de 50 µm (Figure 15). Ces analyses Raman sont réalisées dans 3 zones. Un total de 75 spectres est réalisé par échantillon.

Chaque spectre est ensuite traité à l'aide du logiciel LabSpec (Horiba GR, Jobin Yvon, Lille, France) afin de supprimer le bruit de fond (lissage) et de corriger la ligne de base (correction polynomiale).

3.4.2 Paramètres physicochimiques

A partir des spectres obtenus, les paramètres physicochimiques suivants ont été calculés (Figure 17) :

- Le **rapport minéral/organique** : ratio d'intensité des bandes du $\nu_1 PO_4$ (960 cm^{-1}) et du $\delta(CH_2)$ du collagène (1450 cm^{-1}). Le rapport minéral/organique représente la quantité de minéral présent dans la matrice organique et reflète le contenu minéral du tissu osseux (Morris and Mandair, 2011; Juillard et al., 2010; Olejnik et al., 2014) ;
- Le **contenu relatif en protéoglycanes**, PG (basé sur l'identification des glycoaminoglycanes, GAG) : ratio des aires des bandes du GAG [CH_3] (1365–1390 cm^{-1}) et de l'amide III (1243–1269 cm^{-1}) (Gamsjaeger et al., 2011b). Le contenu

relatif en PG exprimé en fonction du contenu de la matrice organique fournit une information semi-quantitative de la teneur en protéoglycanes synthétisés par les cellules ostéoblastiques. Les GAG sont des facteurs importants dans le processus de minéralisation ; un taux élevé de PG inhibe la minéralisation de la matrice collagénique (Waddington et al., 2003) ;

- La **cristallinité** : inverse de la largeur à mi-hauteur (full width at half maximum intensity, FWHM) de la bande du ν_1PO_4. La cristallinité réfère à la fois à la taille et à la perfection cristalline (stœchiométrie des domaines apatitiques). Ce paramètre augmente au cours des processus minéralisation lors de la transformation des phosphates de calcium amorphes en cristal apatitique ordonné (Morris and Mandair, 2011; Juillard et al., 2010; Olejnik et al., 2014) ;
- Le **contenu en HPO_4** : ratio d'intensité des bandes du $\nu_3 HPO_4^{2-}$ (1003 cm^{-1}) et du $\nu_1 PO_4$ (Goodyear et al., 2009). Le contenu en HPO_4 reflète la conversion des précurseurs non-apatitiques de la couche hydratée en substance minéralisée apatitique et constitue un indicateur de la maturité minérale (Rey et al., 2009) ;
- Le **taux de substitution en CO_3** : ratio d'intensité des bandes du CO_3^{2-}de type B (1071 cm^{-1}) et du $\nu_1 PO_4$. Ces substitutions non-stœchiométriques de type B des ions PO_4 de la maille cristalline favorise l'apparition de modifications structurales du cristal apatitique (lacunes, forme et symétrie) (Morris and Mandair, 2011; Juillard et al., 2010; Olejnik et al., 2014) ;
- Le **rapport hydroxyproline/proline** : ratio d'intensité des bandes de la proline (855 cm^{-1}) et de l'hydroxyproline (870 cm^{-1}). Le rapport hydroxyproline/proline donne une évaluation des modifications post-traductionnelles précoces du collagène (hydroxylation) et témoigne de l'organisation et la stabilité intra-fibrillaire du collagène. Le rapport a été suggéré comme étant lié au profil de minéralisation (Buckley et al., 2012).

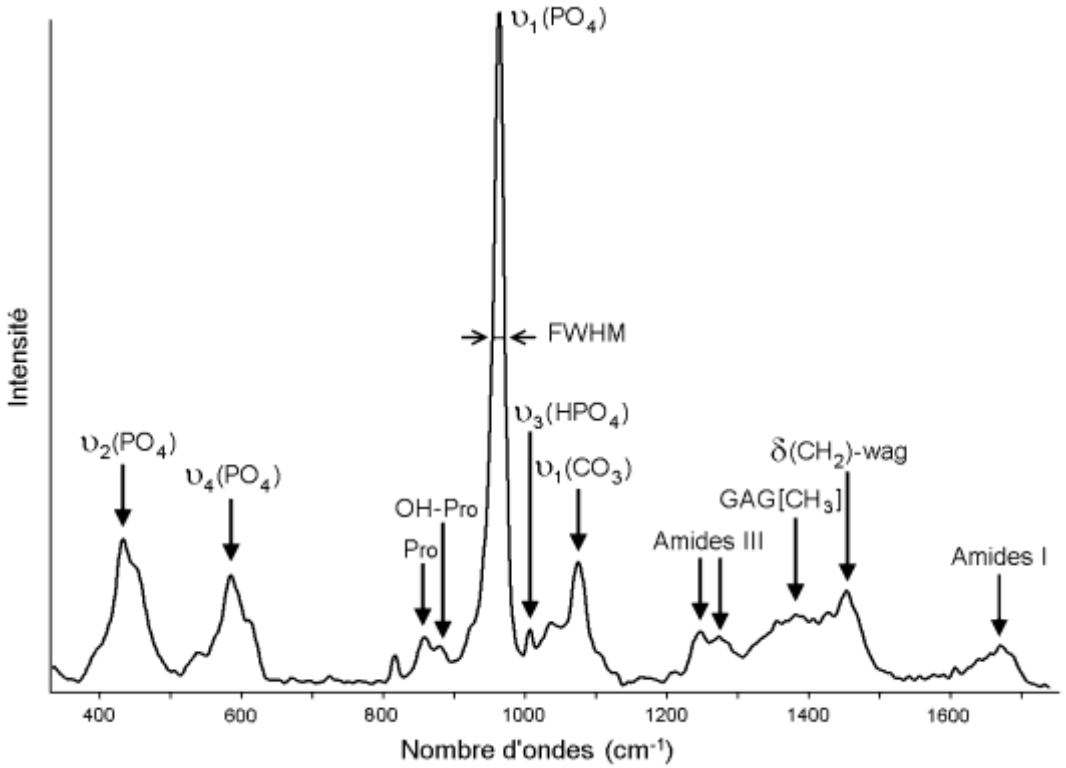

Figure 17 : Spectre Raman du tissu osseux et les différentes bandes d'intérêt utilisées pour le calcul des paramètres physicochimiques.

Les paramètres physicochimiques Raman sont liés au comportement physiopathologique de tissu osseux. De plus, la corrélation de ces paramètres avec les propriétés biomécaniques de l'os est établie (Yerramshetty and Akkus, 2008; Donnelly et al., 2010; Bi et al., 2011; Burket et al., 2011).

Ces analyses sont effectuées avec le logiciel Matlab R2010a (Mathworks, Inc., Natick, MA, USA).

3.4.3 Compatibilité avec le marquage fluorescent

Dans le modèle animal, le choix des régions d'intérêt où l'on effectue les analyses Raman implique l'utilisation de marquages fluorescents. Or la fluorescence pourrait perturber le signal Raman. L'utilisation des cyclines associée aux techniques d'analyse Raman a déjà été reportée (Donnelly et al., 2010; Gamsjaeger et al., 2011b, 2014). Dans ces études, les lignes de marquage fluorescent sont bien individualisées du fait d'une apposition osseuse régulière au niveau du front de minéralisation. Dans notre modèle, les phénomènes d'apposition osseuse sont plus diffus.

Ainsi, du fait de l'absence de lignes de marquage fluorescent individualisées inhérent au modèle de néoformation osseuse, une étude préliminaire a été effectuée pour vérifier l'absence de perturbation du signal Raman du tissu osseux (Olejnik et al., 2011). Il n'existe pas de superposition des bandes du spectre d'émission des cyclines ni de shift des bandes d'intérêt du tissu osseux. Par conséquence, il n'y a pas d'influence sur le calcul des paramètres physicochimiques utilisés dans notre étude. Cette analyse préliminaire a confirmé la possibilité de réaliser nos analyses dans les régions d'intérêt marquées aux cyclines.

3.5 Traitements statistiques

Les résultats sont rapportés comme la moyenne ± déviation standard pour les différents groupes. Le niveau de significativité choisi est de 0,05. Concernant le modèle de néoformation chez le rat, pour chaque animal, la valeur moyenne du gain/perte relative d'un paramètre est considérée comme une unité statistique.

Une comparaison globale des groupes pour chaque paramètre est préalablement réalisée (analyse de variance). Pour chaque paramètre, la comparaison des groupes est effectuée deux à deux par un test *t* de Student. Si nécessaire, les résultats sont ajustés pour l'âge (test PLSD de Fisher).

Les corrélations entre les paramètres sont évaluées par des régressions linéaires simples. Pour les échantillons cliniques, les corrélations entre les paramètres et la durée de traitement par BP sont évaluées par des régressions linéaires simples. Dans le cas du groupe bénin-BP, l'influence de la durée de traitement est évaluée par régression linéaire en utilisant le coefficient ρ de Pearson.

3.6 Analyse statistique multivariée

L'analyse statistique multivariée est réalisée à partir des données spectrales Raman brutes obtenues des échantillons cliniques d'ONM. Cette analyse a été réalisée grâce à l'aide et aux conseils d'Olivier Devos du LASIR, UMR 8516, USTL.

Les spectres Raman complexes, de par la composition hétérogène du tissu osseux, sont traités par l'analyse statistique multivariée avec la méthode de discrimination « Partial Least Square – Discriminant Analyses » (PLS-DA) (Duraipandian et al., 2011;

Juillard et al., 2010). L'analyse PLS-DA est un outil permettant d'évaluer s'il existe des différences spectrales au sein de populations complexes. A la différence des paramètres physicochimiques n'exploitant qu'une partie du spectre Raman, cette analyse traite le spectre dans sa globalité.

En pratique, l'algorithme va maximiser la variabilité inter-groupe et minimiser la variabilité intra-groupe. Le but est de déterminer les variables du spectre décisives dans la séparation de classes (Lennart et al., 2006). La PLS-DA est dite "supervisée" car l'utilisateur précise à l'algorithme la classe d'appartenance de chaque spectre. Cette analyse est effectuée sur l'ensemble des 3600 spectres Raman obtenus pour les échantillons cliniques. Dans notre étude, l'analyse PLS-DA est effectuée en considérant soit deux classes définies correspondant aux groupes CTL et BP ; soit trois classes définies correspondant aux groupes CTL, bénin-BP et malin-BP. Notre but est d'identifier les bandes Raman caractéristiques et représentatives des groupes CTL et BP ou des groupes CTL, bénin-BP et malin-BP.

L'analyse PLS-DA est réalisée avec la fonction PLS Toolbox v6.7 (Eigenvector Research, Inc., West Eaglerock Drive, Wenatchee, WA 98801) fonctionnant dans l'environnement Matlab R2010a (Mathworks Inc., Natick, MA, USA). Seul le prétraitement de normalisation est appliqué avant le calcul. Le nombre optimal de variables est déterminée par une méthode de validation croisée (itérations de sous-ensembles aléatoires).

Chapitre 4. **Résultats**

4.1 Modifications dans le modèle de néoformation osseuse chez le rat

4.1.1 Influence de l'acide zolédronique sur les paramètres physicochimiques

Nous avons évalué pour chaque paramètre la différence du gain/perte relatif lié à la néoformation. Les valeurs présentées correspondent à un gain ou une perte de x' fois la valeur brute à distance. Si la différence entre les groupes CTL et ZA est significative, l'augmentation ou la diminution du gain/perte relatif est quantifiée en pourcentage.

Les variations des paramètres physicochimiques sont les suivantes (Figure 18):

- **Rapport minéral/organique** : gain de 0 à 0,21 fois la valeur brute de l'os distant, à l'exception du groupe ZA-M120 avec une perte de 0,05 fois la valeur brute de l'os distant,
- **Ca_{MOYEN}** : gain de 0,07 à 0,15 fois la valeur brute de l'os distant,
- **Ca_{FWHM}** : perte de 0,02 à 0,07 fois la valeur brute de l'os distant,
- **MaxFreq** : gain de 0,02 à 0,19 fois la valeur brute de l'os distant.
- **Contenu en HPO_4** : gain de 0,06 à 0,21 fois la valeur brute de l'os distant lors de la néoformation pour les séries S120 et M120 – inchangé pour la série M600.
- **Cristallinité** : perte de 0,02 à 0,05 fois la valeur brute de l'os distant pour les séries S120 et M120 – gain important de 0,37 à 0,49 fois la valeur brute de l'os distant pour la série M600.

  La valeur relative de la cristallinité est significativement diminuée de 25 % pour le groupe ZA-M600 par rapport au groupe CTL-M600.
- **Substitution de type B en CO_3** : modifications mineures lors de la néoformation pour les séries S120 et M120 – perte de 0,11 à 0,16 fois la valeur brute de l'os distant pour la série M600.

  La valeur relative de la substitution en CO_3 est significativement augmentée de 33 % pour le groupe ZA-M600 par rapport au groupe CTL-M600.
- **Rapport hydroxyproline/proline** : modifications mineures lors de la néoformation pour les séries S120 et M120 – gain de 0,28 à 0,40 fois la valeur brute de l'os distant pour la série M600.

La valeur relative du rapport hydroxyproline/proline est significativement diminuée de 30 % pour le groupe ZA-M600 par rapport au groupe CTL-M600.

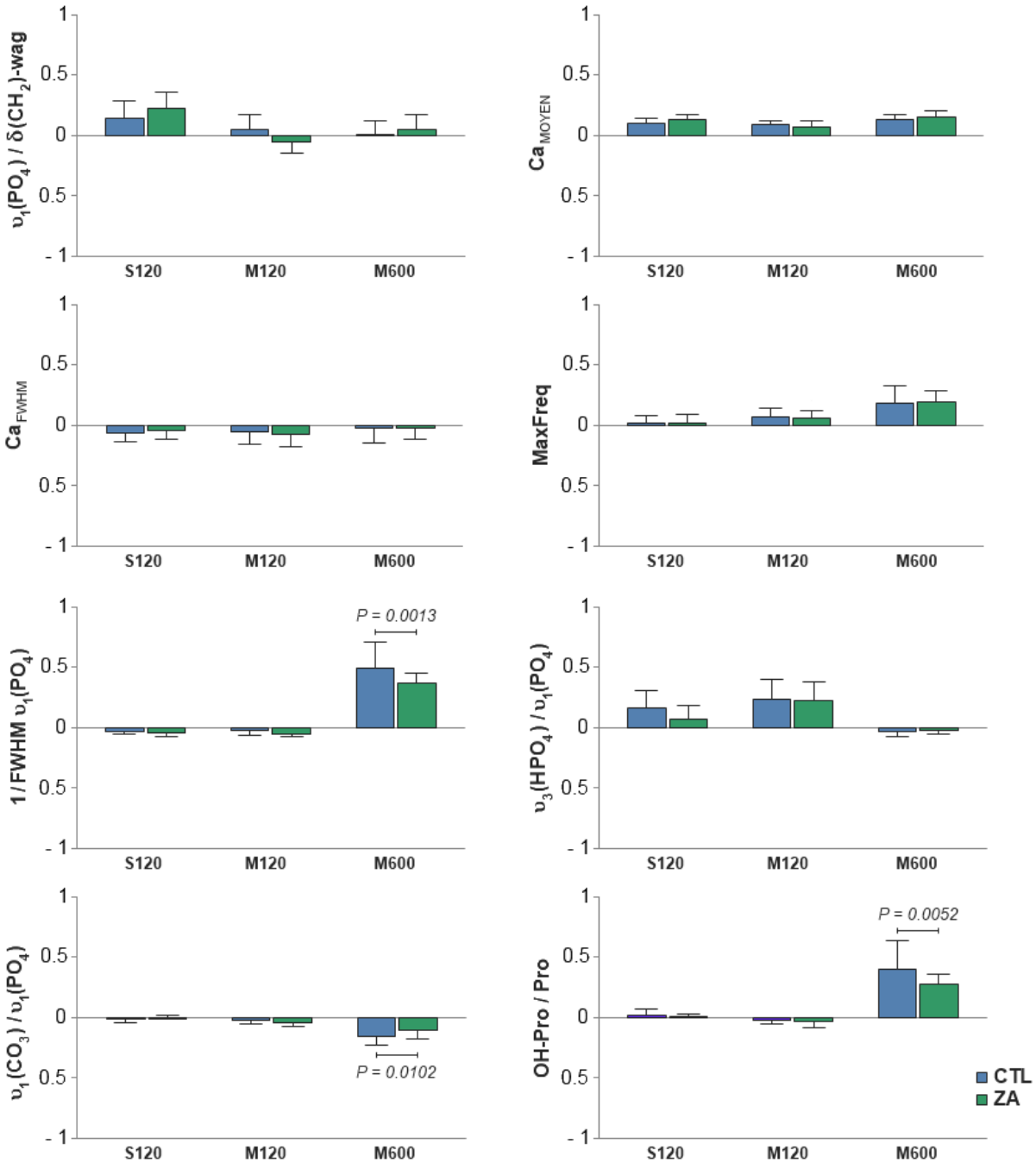

Figure 18 : Variations dans le modèle de néoformation osseuse selon la modalité d'injection (S120, M120 et M600) des paramètres physicochimiques suivants : rapport minéral/organique, Ca_{MOYEN}, Ca_{FWHM}, MaxFreq, cristallinité, contenu en HPO_4, substitution de type B en CO_3, et rapport hydroxyproline/proline. Le gain est matérialisé par des valeurs positives et la perte par des valeurs négatives, et correspondent à x-fois la valeur brute de l'os distant. Le niveau de significativité *P* des différences significatives entre les groupes ZA et CTL est mentionné.

En résumé, quelle que soit la modalité d'injection (S120, M120 ou M600), les variations mesurées pour les paramètres liés au degré, à l'hétérogénéité de minéralisation et à la maturité minérale ne sont pas significatifs. La cristallinité, la substitution en CO3 et le rapport proline/hydroxyproline sont significativement différents entre les groupes CTL et ZA pour la seule modalité d'injection M600.

4.1.2 Influence du fractionnement de la dose

Afin d'évaluer l'effet du fractionnement de la dose, les variations de chaque paramètre sont évaluées entre les séries S120 et M120. Nous avons comparé les moyennes des paramètres respectivement entre les groupes CTL-S120 et CTL-M120 et, entre les groupes ZA-S120 et ZA-M120 (Tableau 6).

Nous observons une influence du fractionnement de la dose pour les paramètres suivants :

- **Rapport minéral/organique** : la valeur relative du rapport minéral/organique est significativement diminué de 49 % pour le groupe ZA-S120 par rapport au groupe ZA-M120.
- **Ca_{MOYEN}** : la valeur relative du Ca_{MOYEN} est significativement diminuée de 88 % pour le groupe ZA-S120 par rapport au groupe ZA-M120.
- **Contenu en HPO_4** : la valeur relative du contenu en HPO_4 est significativement diminuée de 71 % pour le groupe ZA-S120 par rapport au groupe ZA-M120.

Ces différences entre les séries S120 et M120 concernant ces paramètres ne sont pas observées pour les groupes CTL.

Tableau 6 : Comparaisons des paramètres physico-chimiques entre les groupes ZA-S120 et ZA-M120, et entre les groupes CTL-S120 et CTL-M120. Les niveaux de significativité *P* des différences sont indiqués ; les différences significatives sont en caractère gras.

Paramètres	CTL-S120 *versus* CTL-M120	ZA-S120 versus ZA-M120
Rapport minéral/organique	0,1139	**0,0003**
Ca_{MOYEN}	0,3010	**<0,0001**
Ca_{FWHM}	0,7098	0,6187
MaxFreq	0,1713	0,2084
Cristallinité	0,9295	0,9590
Contenu en HPO_4	0,5498	**0,0006**
Substitution de type B en CO_3	0,9857	0,8891
Rapport hydroxyproline/proline	0,6852	0,5926

Ces résultats indiquent un contenu minéral plus important et plus mature lors de la néoformation osseuse pour une dose administrée en une fois que lorsque cette même dose est administrée de manière fractionnée.

4.1.3 Influence du dosage

Afin d'évaluer l'effet du dosage, les variations de chaque paramètre sont évaluées entre la série M600 et les séries S120 et M120. Après ajustement de l'âge, nous avons comparé les paramètres, respectivement entre le groupe ZA-M600 et les groupes ZA-S120 et ZA-M120 et, entre le groupe CTL-M600 et les groupes CTL-S120 et CTL-M120 (Tableau 7).

Nous observons après correction statistique de l'âge, des différences significatives entre les groupes M600 et leurs groupes respectifs S120 et M120 pour de nombreux paramètres. Nous ne pouvons néanmoins conclure concernant l'influence du dosage. En effet, les différences entre la série M600 et les séries S120 et M120 sont retrouvées aussi bien dans les groupes CTL et ZA. Le design de l'étude ne permet pas de dissocier un potentiel effet dose de l'effet du délai de cicatrisation plus long pour la série M600.

Tableau 7 : Evaluation des différents paramètres après correction de l'âge : les comparaisons des moyennes sont effectuées entre respectivement le groupe ZA-M600 et les groupes ZA-S120 et ZA-M120, et le groupe CTL-M600 et les groupes CTL-S120 et CTL-M120. Les niveaux de significativité *P* des différences sont indiqués ; les différences significatives sont en caractère gras.

Paramètres	CTL-M600 *versus* :		ZA-M600 *versus* :	
	CTL-S120	CTL-M120	ZA-S120	ZA-M120
Rapport minéral/organique	**0,0484**	**0.0416**	**0,0048**	**0,0188**
Ca_{MOYEN}	0,0606	**0,0026**	0,2127	**<0,0001**
Ca_{FWHM}	0,3715	0,4114	0,6916	0,1802
MaxFreq	**0,0011**	**0,0202**	**<0,0001**	**0,0002**
Cristallinité	**<0,0001**	**<0,0001**	**<0,0001**	**<0,0001**
Contenu en HPO_4	**0,0003**	**<0,0001**	**0,0214**	**<0,0001**
Substitution de type B en CO_3	**0,0002**	**<0,0001**	**0,0116**	**0,0047**
Rapport hydroxyproline/proline	**<0,0001**	**<0,0001**	**<0,0001**	**<0,0001**

4.1.4 Etude des corrélations entre les paramètres physicochimiques

Afin d'évaluer l'interdépendance entre les paramètres MEBE et Raman, différentes corrélations ont été testées dans notre modèle de néoformation. Nous avons établi les corrélations entre chaque paramètre pour chaque groupe de chaque série (annexe A3).

Des corrélations sont mises en évidence au sein de la série M600 et concernent les paramètres suivants (Figure 19 et Figure 20) :

- **Rapport hydroxyproline/proline** et **cristallinité** : corrélation positive forte ;
- **Contenu en HPO_4** et **rapport minéral/organique** : corrélation négative modeste.

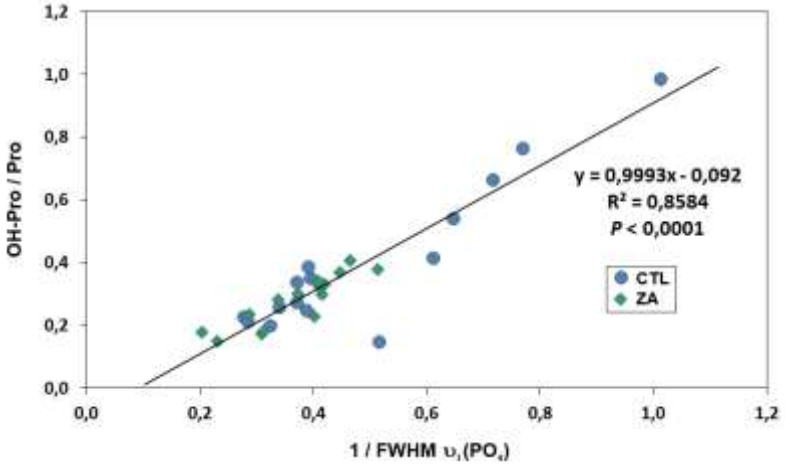

Figure 19 : Corrélation positive entre le rapport hydroxyproline/proline et la cristallinité pour la série M600 (groupes CTL et ZA). Pour illustration, les groupes CTL et ZA sont représentés par des sigles distinctifs. L'équation de la courbe, la valeur du R^2 et le niveau de significativité *P* sont indiqués.

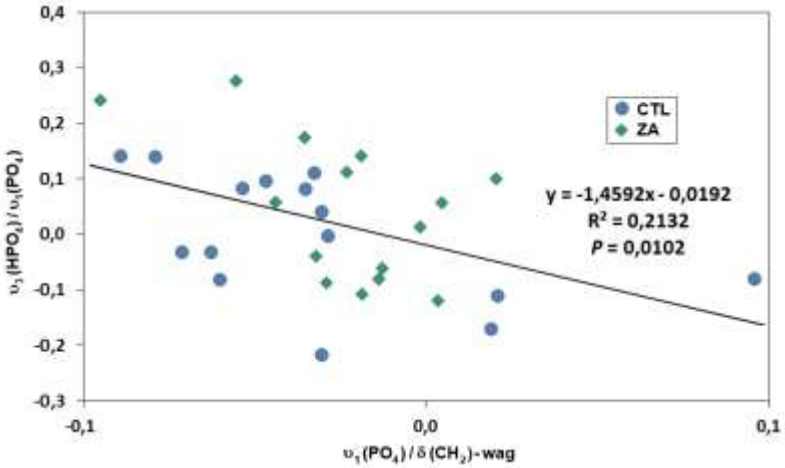

Figure 20 : Corrélation négative entre le contenu en HPO_4 et le rapport minéral/organique pour la série M600 (groupes CTL et ZA). Pour illustration, les groupes CTL et ZA sont représentés par des sigles distinctifs. L'équation de la courbe, la valeur du R^2 et le niveau de significativité *P* sont indiqués.

4.2 Modifications des séquestres osseux d'ostéonécrose des maxillaires liée aux bisphosphonates

4.2.1 Influence sur les paramètres physicochimiques

Les différents paramètres Raman sont tout d'abord évalués en comparant l'ensemble du groupe BP au groupe CTL.

Les variations des paramètres physicochimiques sont les suivantes (Figure 21 et Figure 22) :

- **Rapport minéral/organique** augmenté de 12 % dans le groupe BP par rapport au groupe CTL ;
- **Contenu relatif en protéoglycanes** diminué de 35 % dans le groupe BP par rapport au groupe CTL, indiquant une initiation de la minéralisation favorisée ;
- **Cristallinité** diminuée de 2 % dans le groupe BP par rapport au groupe CTL ;
- **Contenu en en HPO_4** augmenté de 41 % dans le groupe BP par rapport au groupe CTL ;
- **Substitutions de type B en CO_3** inchangée.

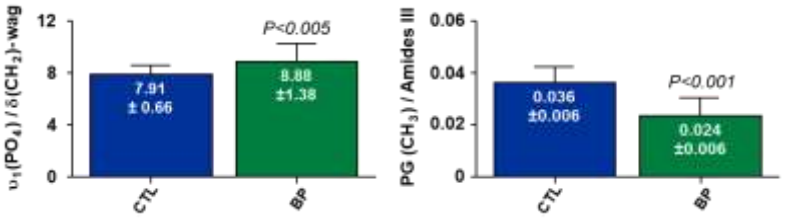

Figure 21 : Comparaison des moyennes ± SD entre les groupes CTL et BP des paramètres Raman liés à la minéralisation : rapport minéral/organique et le contenu en PG. Le niveau de significativité *P* est mentionné.

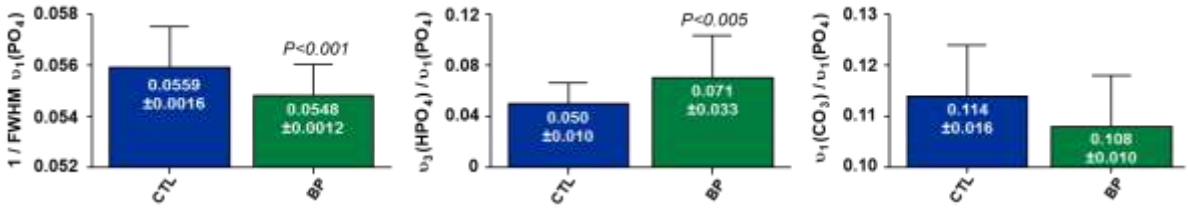

Figure 22 : Comparaison des moyennes ± SD entre les groupes CTL et BP des paramètres Raman de cristallinité, du contenu en HPO_4 et de la substitution de type B en CO_3. Le niveau de significativité *P* est mentionné.

4.2.1 Influence de la pathologie sous-jacente en relation avec la molécule et la durée de traitement

Afin de tester l'influence de la pathologie sous-jacente liée à la molécule de BP, la dose et/ou le mode d'administration, nous avons évalué ces différences dans les groupes bénin-BP et malin-BP.

Nous observons des différences similaires (Figure 23 et Figure 24) :

- **Rapport minéral/organique** augmenté de 14 % dans le groupe malin-BP par rapport au groupe CTL, mais inchangé pour le groupe bénin-BP ;
- **Contenu relatif en protéoglycanes** diminué de manière similaire dans les groupes bénin-BP et malin-BP de respectivement 34 % et 36 % par rapport au groupe CTL, indiquant une initiation de la minéralisation favorisée ;
- **Cristallinité** diminuée de manière plus importante dans le groupe malin-BP (2,3 %) que dans le groupe bénin-BP (1,2 %) par rapport au groupe CTL ;
- **Contenu en en HPO_4** augmenté de manière similaire dans les groupes bénin-BP et malin-BP de respectivement 39 % et 43 % par rapport au groupe CTL ;
- **Substitutions de type B en CO_3** inchangée dans les 2 groupes.

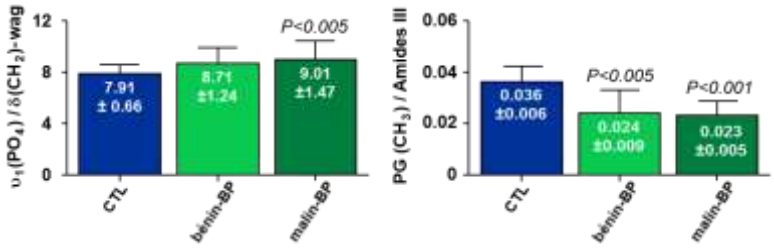

Figure 23 : Comparaison des moyennes ± SD entre les groupes CTL et BP des paramètres Raman liés à la minéralisation : rapport minéral/organique et le contenu en PG. Le niveau de significativité *P* est mentionné.

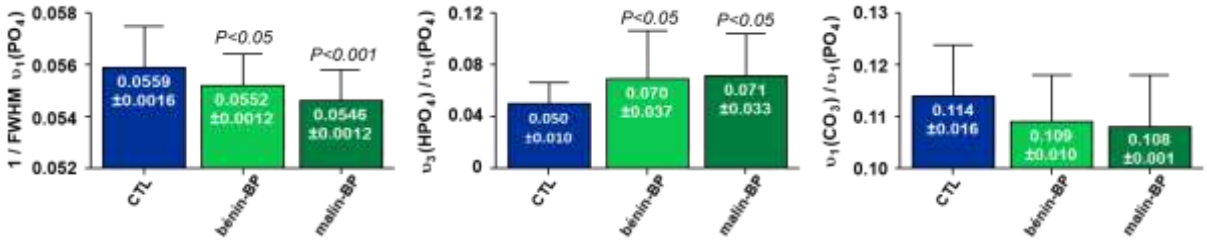

Figure 24 : Comparaison des moyennes ± SD entre les groupes CTL et BP des paramètres Raman de cristallinité, du contenu en HPO_4 et de la substitution de type B en CO_3. Le niveau de significativité *P* est mentionné.

Aucune différence n'a pu être observée en comparant les groupes bénin-BP et malin-BP.

En complément, nous avons observé une corrélation entre la diminution de la **substitution de type B en CO_3** et la durée de traitement dans le groupe malin-BP (Figure 25). Cette corrélation n'est pas observée pour le groupe bénin-BP.

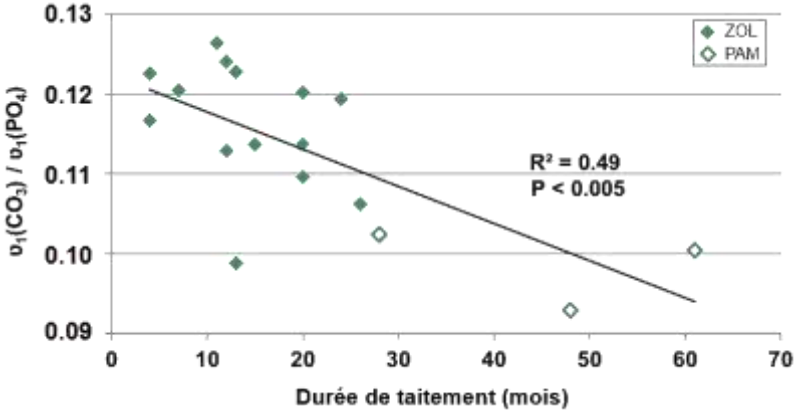

Figure 25 : Corrélation négative entre le taux de substitution de type B en CO_3 et la durée de traitement des BP dans le groupe malin-BP. Un sigle distinctif représente la molécule de BP utilisée lors du traitement ou utilisée le plus longtemps en cas de traitement combiné. La valeur du R^2 et le niveau de significativité *P* sont indiqués.

4.2.2 Apport de l'analyse statistique multivariée

Une bonne séparation entre les groupes est obtenue par l'analyse par PLS-DA. Les scores de fiabilité et de robustesse de la modélisation obtenue sont corrects (Tableau 8) aussi bien pour l'analyse PLS-DA de deux classes (CTL/BP) ou de trois classes (CTL/bénin-BP/malin-BP).

Tableau 8 : Scores de fiabilité (sensibilité et spécificité) et de robustesse (Root Mean Square Error Calibration, RMSEC et Root Mean Square Error Cross Validation, RMSECV) de l'analyse PLS-DA retenue. La fiabilité de l'analyse PLS-DA correspond à une sensibilité et une spécificité proche de 100 % ; la robustesse correspond à des valeurs de RMSEC et RMSECV voisines et se rapprochant au maximum de zéro

Scores	CTL n=24	BP n=24	CTL n=24	bénin-BP n=8	malin-BP n=16
Sensibilité (%)	90,9	87,8	93,5	78,1	76,6
Spécificité (%)	86,3	91,6	83	65,3	79,8
RMSEC	0,326	0,320	0,341	0,364	0,393
RMSECV	0,326	0,320	0,341	0,364	0,394

L'attribution de la classe pour les différents spectres et la séparation des spectres de chaque groupe est correctement modélisée. Néanmoins, les bandes spectrales caractéristiques des groupes bénin-BP et malin-BP obtenues par l'analyse PLS-DA de trois classes sont similaires entre les groupes bénin-BP et malin-BP, et similaires à celles du groupe BP de l'analyse PLS-DA de deux classes. Aussi par souci de clarté, seules la séparation des groupes CTL et BP et leurs bandes spectrales caractéristiques sont représentées Figure 26 et Figure 27.

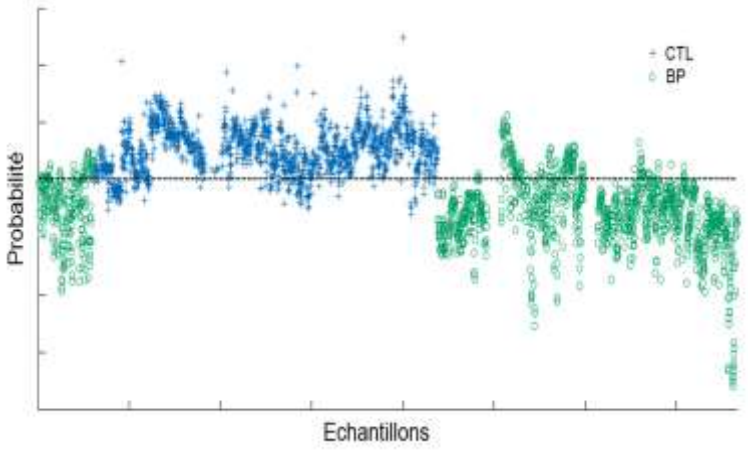

Figure 26 : Discrimination des groupes CTL et BP par l'analyse PLS-DA. Une valeur seuil représentée par la ligne discontinue délimite les spectres assignés au groupe CTL (au-dessus) de ceux assignés au group BP (en-dessous) à partir de la modélisation effectuée. Chaque spectre est représenté par un symbole propre au groupe auquel il appartient réellement.

Les bandes spectrales discriminantes de chaque groupe sont les suivantes (Figure 27) :

- Groupe CTL : bandes à 1035, 1452, et 1657 cm^{-1}, attribuées respectivement aux bandes du ν_3 PO_4, du $\delta(CH_2)$ et $\delta as(CH_3)$ des protéines associé au $\delta(CH_2)$ des lipides, et de l'amide I (α hélix) ;
- Groupe BP : bande à 1001 cm^{-1} attribuées au ν_3 HPO_4.

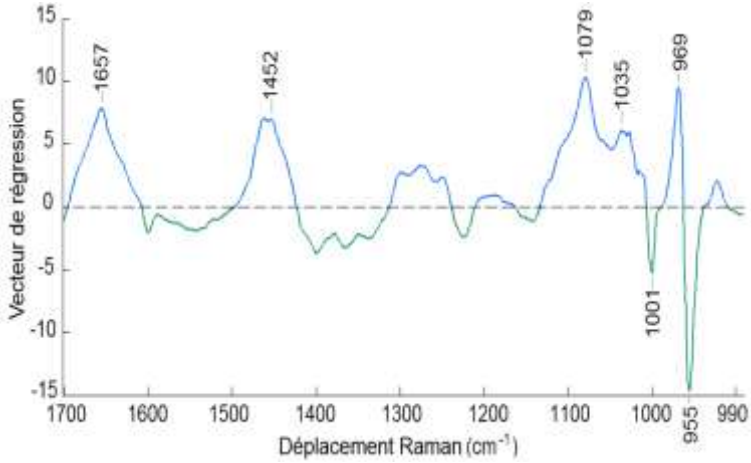

Figure 27 : Vecteur de régression calculé par l'analyse PLS-DA identifiant les bandes spectrales Raman discriminantes du groupe CTL (valeurs positives) ou du groupe BP (valeurs négatives).

De plus, au niveau de la bande du ν_1 PO_4, une bande positive à 969 cm^{-1} pour le groupe CTL et une bande négative à 955 cm^{-1} pour le groupe BP sont observées. Cette forme spécifique en « S allongé » est caractéristique d'un shift de bande significatif. Le shift de bande de 2 cm^{-1} observé sur les spectres bruts moyennés au niveau du ν_3 PO_4 est donc significatif (Figure 28).

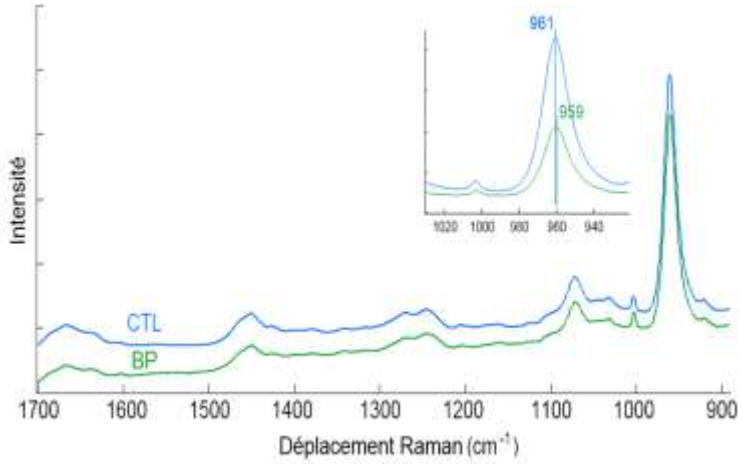

Figure 28 : Spectres bruts Raman moyens des groupes CTL et BP. L'agrandissement montre le shift de bande du $\upsilon_1(PO_4)$ de 961 à 959cm^{-1} entre respectivement le groupe CTL et le groupe BP.

Chapitre 5. **Discussion**

5.1 Modifications structurales du minéral osseux

Dans ce travail, l'organisation et la composition apatitique sont mesurées par la cristallinité, la substitution en carbonates et la maturité minérale du tissu osseux. La cristallinité réfère à la fois à la taille et à la perfection cristalline (stœchiométrie des domaines apatitiques). Elle est démontrée comme étant corrélée en microspectroscopie Raman à la longueur de l'axe *c* des apatites (Morris and Mandair, 2011; Yerramshetty et al., 2006). Cependant, elle est également influencée par la maturation cristalline. En effet, durant la maturation cristalline, la taille des cristaux apatitiques augmente, ce qui se traduit par une bande du $\upsilon_1(PO_4)$ plus étroite, soit une cristallinité augmentée (Kazanci et al., 2006). De plus, des altérations dans la perfection stœchiométrique du cristal modifient également la forme de la bande du $\upsilon_1(PO_4)$. Une augmentation des substitutions en carbonates se traduit donc par un élargissement de la bande du $\upsilon_1(PO_4)$, soit une cristallinité diminuée (Morris and Mandair, 2011; Yerramshetty et al., 2006). De cette façon la maturité minérale et les substitutions en carbonates vont également influencer la structure cristalline et sont considérées nécessaires dans notre étude à l'interprétation des variations de la cristallinité. La maturité minérale correspond à la conversion des précurseurs non-apatitique (dont les phosphates monohydrogène) de la couche hydratée en apatites minérales stables. Les précurseurs non-apatitiques labiles diminuent lors de la maturation minérale du tissu osseux (Rey et al., 2009). Ces précurseurs de la couche hydratée sont accessibles car le signal Raman des molécules d'eau ne se superpose pas aux bandes d'intérêt étudiées. Dans cette étude, la maturité minérale est donc représentée par la diminution du contenu en phosphates monohydrogène (Goodyear et al., 2009) ; la substitution en carbonates de type B, étant majoritaire, est celle étudiée (Morris and Mandair, 2011; Yerramshetty et al., 2006).

D'autre part, les conséquences physicochimiques de l'incorporation des BP au niveau des apatites osseuses sont à interpréter en prenant en considération le modèle. En effet, les variations peuvent être attribuées aux conséquences de la liaison/interaction des BP à la maille apatitique lors de la croissance cristalline (modèle de néoformation) mais elles peuvent être également la résultante d'une maturation prolongée du tissu osseux (séquestres d'ONM).

Dans nos travaux, la cristallinité diminue, que ce soit dans le modèle de néoformation sous l'effet de fortes doses de Zol (équivalent malin) ou pour les séquestres d'ONM aussi bien pour des doses bénignes ou malignes. Ceci suggère une implication des BP dans l'équilibre stœchiométrique des cristaux apatitiques. Des études précédentes chez l'Homme ont également montré une diminution similaire après un traitement prolongé par BP (Bala et al., 2011, 2012; Durchschlag et al., 2006). Ces effets similaires ont également été reportés dans des zones actives de formation osseuse chez des femmes ostéoporotiques traités par Zol (Gamsjaeger et al., 2013, 2011b) ; cette diminution de la cristallinité est attribuée à un effet direct du Zol lors de l'apposition de la matrice minérale par les ostéoblastes et/ou au cours de la maturation du minéral. Dans le modèle de néoformation, l'utilisation d'un marquage aux cyclines permet de réaliser des comparaisons de zones d'un même âge tissulaire. D'autre part, la maturité minérale ne varie pas puisque le contenu en phosphates monohydrogène est identique sous l'effet du Zol. Il semble donc que ces variations de cristallinité soit imputables aux modifications de l'environnement cristallin lors de la formation apatitique et suite à l'incorporation et à la liaison/interaction du Zol aux apatites osseuses.

Considérons la variation de la substitution de type B en carbonates associée à la diminution de la cristallinité dans le modèle de néoformation sous l'effet de fortes doses de Zol (équivalent malin). Une diminution similaire de la substitution de type B en carbonates *in vitro* avait préalablement été reporté lors de l'imprégnation passive d'échantillons biologiques osseux par le Zol (Juillard et al., 2010). D'autres études chez des femmes ostéoporotiques traitées par le Zol avait confirmé ces résultats au niveau de zones actives de formation osseuse (Gamsjaeger et al., 2013, 2011b). Rappelons qu'ici, le marquage aux cyclines permet aussi d'étudier un même âge tissulaire. Les variations de substitutions de type B en carbonates sont donc, dans notre étude, indépendantes d'un effet physiologique de l'âge du sujet ou de l'âge tissulaire comme il a pu être reporté (Akkus et al., 2003; Donnelly et al., 2010; Yerramshetty et al., 2006). De plus, cette diminution de la substitution de type B en carbonates serait dépendante de la dose cumulée de BP, puisque pour des dosages malins pour les séquestres, la diminution de la carbonatation est significativement corrélée à la durée de traitement. Nous pouvons donc envisager un effet direct de la liaison/interaction des BP au sein de la maille cristalline qui perturberait l'équilibre stœchiométrique, les substitutions et, par conséquent, l'agencement cristallin des apatites biologiques. La liaison des BP aux apatites implique dans les modélisations *in vitro* le calcium (Chen et al., 2012b; Kim et al., 2010; Pascaud

et al., 2013) et/ou le phosphate (Mukherjee et al., 2008; Pascaud et al., 2013). Il est probable que l'incorporation de Zol lors de la croissance cristalline des apatites biologiques puisse entrainer un encombrement sur le site du phosphate et une réorganisation de la maille cristalline impactant les substitutions et vacances possibles. Cette réorganisation et/ou la fixation du BP se ferait au détriment des carbonates pouvant se substituer sur le site du phosphate comme démontré *in vitro* (Juillard et al., 2010).

Concernant les séquestres osseux d'ONM, à la fois la cristallinité et la maturité minérale sont diminuées sous l'effet des BP aussi bien pour des dosages bénins et malins. D'autres études évoquent une diminution de la maturité minérale en considérant que la maturité minérale est directement corrélée à la cristallinité (Gamsjaeger et al., 2013, 2011b; Hofstetter et al., 2012) ou à l'index « maturité minérale / cristallinité » (Durchschlag et al., 2006). Néanmoins, une étude récente a confirmé que la maturité minérale et la cristallinité sont bien deux variables qui peuvent évoluer selon certaines conditions de manière indépendante et indépendamment au remodelage osseux (Farlay et al., 2010). Peu d'études à ce jour se sont intéressées aux variations de la maturité minérale sous l'effet des BP. La seule à notre connaissance a reporté des résultats contradictoires aux résultats des séquestres osseux avec une cristallinité également diminuée mais une maturité minérale augmentée sous l'effet de l'Aln (Bala et al., 2011). Cette augmentation de maturité minérale serait liée à une maturation secondaire plus avancée sous l'effet du BP. Dans le cas des séquestres d'ONM, malgré une maturation en théorie plus importante du fait de l'action antiresorptive des BP, le contenu en phosphates monohydrogène est augmenté aussi bien pour des dosages bénins et malins. A l'échelle tissulaire, une interposition de zones d'os fibreux est décrite au sein des zones nécrotiques à proximité du tissu lamellaire résiduel (Bedogni et al., 2008; Favia et al., 2009). Dans notre étude, seules des zones d'os lamellaire ont été analysées. A l'échelle de l'ostéon, l'interposition d'os fibreux a également été décrit de manière physiologique au sein de structures lamellaires (Reznikov et al., 2014). A l'échelle moléculaire, la distinction du signal Raman entre un os immature et un os lamellaire est aisée (Uthgenannt et al., 2007). De plus, au cours de la maturation tissulaire la position de la bande du $\upsilon_1(PO_4)$ peut varier selon l'hétérogénéité de l'organisation apatitique et la contribution entre les composés immatures et les apatites cristallines (Tarnowski et al., 2002). Dans notre étude, le signal Raman obtenu diffère sans ambigüité d'un signal d'os immature. Il semble donc que l'augmentation des phosphates monohydrogène observée sur les séquestres d'ONM ne

soit pas attribuable uniquement à l'immaturité tissulaire. Les remaniements liés à la nécrose pourraient impacter directement la phase labile et augmenter le contenu en phosphates monohydrogène labiles. Ces modifications physicochimiques des apatites sont d'ailleurs confirmées par l'analyse statistique multivariée. Cependant, en dehors d'un contenu élevé en phosphates monohydrogène labiles caractéristique des séquestres, le shift mis en évidence au niveau de la bande du $\upsilon_1(PO_4)$ témoigne de deux structures apatitiques différentes entre les séquestres et les os témoin. On peut raisonnablement considérer que les modifications observées de la structure de la maille apatitique des séquestres d'ONM soient liées à des phénomènes de minéralisation antérieure à la séquestration de l'échantillon observé et, considérer que celles-ci sont liées au BP.

5.2 Modifications structurales du collagène osseux lors de la néoformation

Le rapport hydroxyproline/proline a été utilisé dans notre modèle de néoformation pour étudier la stabilité intra-chaîne du collagène. En effet lors de la mise en place des fibrilles de collagène, des modifications post-traductionnelles d'hydroxylation sont observés, en particulier au niveau des résidus de proline. Cette hydroxylation permet la stabilisation de la structure hélicoïdale du collagène par la formation de liaisons hydrogène (Krane, 2008; Viguet-Carrin et al., 2006). Les fibrilles dans lesquelles la proline n'est pas hydroxylée sont moins stables (Bella et al., 1995). L'utilisation des bandes de proline et d'hydroxyproline a récemment été suggérée en microspectroscopie Raman comme représentatif quantitativement du collagène de la matrice osseuse (Karampas et al., 2013). Les auteurs ont montré que la somme des intensités de ces bandes est constante et représentative du contenu en collagène, et que le ratio pouvait fluctuer selon le taux d'hydroxylation.

Au cours de la néoformation, le rapport hydroxyproline/proline est diminué sous l'effet de fortes doses de Zol (équivalent malin) indiquant une réduction de l'hydroxylation des prolines et par conséquence, une diminution de la stabilité intra-chaîne du collagène. Les modifications post-traductionnelles inter-fibrillaires sous l'effet des BP ont largement été décrites dans le cas de l'évaluation des liaisons croisées du collagène (Allen et al., 2008; Bala et al., 2012; Boskey et al., 2005; Burket et al., 2013; Durchschlag et al., 2006; Gamsjaeger et al., 2011a; Geoffroy et al., 2011; Hofstetter et

al., 2012; Saito et al., 2008). Par la suppression du remodelage due à une utilisation prolongée, les BP entrainent une augmentation du nombre de liaisons croisées matures, soit une augmentation de la maturité du collagène (Allen et al., 2008; Bala et al., 2012; Durchschlag et al., 2006; Saito et al., 2008). Cependant, ces variations sont également décrites dans des zones actives de formation osseuse de manière indépendante au remodelage osseux (Gamsjaeger et al., 2011a; Hofstetter et al., 2012). Dans notre étude, l'effet du Zol observé sur la stabilité intra-chaîne du collagène se produit dès un stade précoce de maturation du collagène au niveau du réticulum endoplasmique des cellules ostéoblastiques (Krane, 2008; Viguet-Carrin et al., 2006). Lors de la première injection de Zol deux semaines après la chirurgie, la production de collagène par les cellules ostéoblastiques a été démontré comme maximum dans des conditions similaires de réparation de défaut osseux chez le rat (Itagaki et al., 2008). Les résultats suggèrent par conséquent une action du Zol dans la maturation du collagène lors des mécanismes de formation de la matrice osseuse et, une implication potentielle des cellules ostéoblastiques. Une étude précédente a démontré l'internalisation de petites quantités de BP par les cellules ostéoblastiques (Coxon et al., 2008). Les BP influencent *in vitro* l'activité ostéoblastique avec des effets sur l'inhibition de la prolifération et sur la différenciation (Kaiser et al., 2013; Plotkin et al., 2006; Reinholz et al., 2000), mais aussi des effets divergents selon la dose sur l'expression collagénique (Basso et al., 2013; Koch et al., 2010; Reinholz et al., 2000; von Knoch et al., 2005) et sur la production minérale (Xiong et al., 2009; Frediani et al., 2004; Pan et al., 2004). Par ailleurs, les BP pourraient interagir sur les voies métaboliques du cholestérol au niveau des cellules ostéoblastiques. D'autres traitements (statines) ont évoqué de manière similaire l'importance des voies du mévalonate sur la formation osseuse (Viccica et al., 2007; Weivoda and Hohl, 2011). A ce jour cependant aucun effet direct *in vivo* sur les cellules ostéoblastiques n'a pu être établi, il est difficile en raison du couplage ostéoclastes/ostéoblastes de différencier les effets directs des BP de ses effets indirects sur le cycle de remodelage osseux.

Les modifications du rapport hydoxyproline/proline observées ont été corrélées positivement aux variations de la cristallinité pour des fortes doses de Zol (équivalent malin) lors de la néoformation. L'implication de ces modifications dans la variabilité des profils de minéralisation a été évoquée chez l'animal en fonction de l'espèce (Buckley et al., 2012). De plus et de manière plus générale, les modifications post-traductionnelles du collagène sont connues pour être impliquées dans les mécanismes de minéralisation dans

le cas des pathologies de fragilité osseuse (Eyre and Weis, 2013). Dans le modèle de néoformation, cette corrélation peut s'expliquer par les mécanismes mis en place lors de l'initiation de la minéralisation. Lors de la formation osseuse, l'arrangement des fibres de collagène constitue une matrice qui va guider les dépôts de cristaux phosphocalciques apatitiques (Wang et al., 2012). Les cycles des prolines et des hydroxyprolines des chaînes α du collagène sont situés à l'extérieur de la triple hélice pour faciliter la liaison aux ions calcium (Yang and Cui, 2007; Zhang et al., 2004). Du fait de son groupement hydroxyl supplémentaire, l'hydroxyproline permet des interactions plus forte avec les surfaces apatitiques (Almora-Barrios et al., 2009). Ainsi, l'hydroxylation des résidus de proline favoriserait l'arrangement et la croissance des apatites osseuses. De plus, l'hydroxylation permettant une meilleure stabilisation de la structure hélicoïdale du collagène (Krane, 2008; Viguet-Carrin et al., 2006), elle influence également l'architecture de la matrice fibrillaire et oriente donc indirectement la croissance des cristaux.

5.3 Variations du contenu minéral lors du remodelage osseux

Pour les séquestres osseux d'ONM, le rapport minéral/organique est augmenté sous l'action des BP par rapport aux témoins sains. Cette hyperminéralisation est également confirmée par l'analyse statistique multivariée où le contenu minéral est retrouvé prédominant et caractéristique du groupe traité par BP. Des études chez le chien ont déjà reporté une minéralisation plus importante sous l'effet des BP par rapport aux animaux non traités (Gourion-Arsiquaud et al., 2010; Saito et al., 2008). Les études chez l'Homme ont montré une amélioration de la minéralisation permettant la stabilisation par les BP des effets délétères de l'ostéoporose en comparaison à une absence de traitement (Bala et al., 2011; Boskey et al., 2009; Gamsjaeger et al., 2011b). Ces études ont essentiellement évalué l'efficacité du traitement par BP dans le cadre de l'ostéoporose. Néanmoins, la pathologie ostéoporotique est associée à une diminution de la minéralisation (Bala et al., 2012) et les traitements par BP pourraient uniquement combler le déficit de minéralisation. A ce jour, aucune étude n'avait montré chez l'Homme un effet de minéralisation supérieure à la norme ou en comparaison à une population saine. Pourtant suite à une inhibition du remodelage, les BP augmentent l'âge tissulaire et prolongent la minéralisation secondaire du tissu osseux (Bala et al., 2012; Boivin et al., 2000). Cet effet sur la minéralisation secondaire pourrait non seulement augmenter

l'homogénéité tissulaire, mais aussi augmenter le degré de minéralisation. Dans le cas particulier des maxillaires, nous observons les effets sur la minéralisation issus d'une accumulation plus importante que dans d'autres sites osseux (Hokugo et al., 2013; Reid et al., 2007; Wen et al., 2011). D'autre part, du fait d'un remodelage plus important au niveau des maxillaires, les différences de minéralisation entre os traité et os sain peuvent également témoigner d'un différentiel plus important d'âge tissulaire.

Pourtant, en séparant les observations selon la pathologie (bénigne ou maligne), l'augmentation de la minéralisation n'est observable que pour les fortes doses de BP (groupe malin). Bien que la durée de traitement soit moins importante dans le groupe malin, les doses utilisées sont non seulement plus importantes, mais les modalités d'administration diffèrent, avec une administration exclusivement par voie intraveineuse pour le groupe malin (voie orale pour le groupe bénin). Il a été établi que seul 1 % de dose par voie orale est absorbé au niveau osseux, contre plus de 50 % par voie intraveineuse (Reszka and Rodan, 2003). Les différences de dose cumulée entre nos deux groupes traités par BP est donc importante. De plus, la majorité des patients du groupe malin est traitée par le Zol qui présente une affinité et un potentiel antirésorptif plus important (Leu et al., 2006). Ainsi, la complexité et la multiplicité des facteurs présents simultanément rendent difficile une interprétation claire sur un effet de la dose, de la durée de traitement et de la molécule. Enfin, n'ayant pas observé de différence sur les paramètres de minéralisation dans le modèle animal quel que soit la dose de ZA, il est vraisemblable que ces effets soient observables à plus long terme et/ou lors d'une inhibition massive du remodelage.

En complément de l'évaluation de la minéralisation, nous avons déterminé également le contenu relatif en protéoglycanes. Ce paramètre Raman, récemment décrit dans la littérature, est inversement corrélé à l'initiation de la minéralisation sur la matrice collagénique (Gamsjaeger et al., 2011b; Hofstetter et al., 2012). La proportion de protéoglycanes du contenu organique témoigne de la sécrétion et de la régulation ostéoblastique des processus de minéralisation (Lamoureux et al., 2007; Waddington et al., 2003). Par leur capacité de liaison au calcium, les protéoglycanes interagissent avec les cristaux phosphocalciques apatitiques. Un fort taux de protéoglycanes inhibe les processus de minéralisation de la matrice collagénique en régulant l'apposition minérale et la croissance cristalline (Waddington et al., 2003). Ce paramètre nous permet donc

d'évaluer indépendamment de la maturation tissulaire le processus de minéralisation primaire.

Dans les séquestres osseux, une diminution du contenu relatif en protéoglycanes est observée sous l'effet des BP de manière similaire aux études précédentes (Gamsjaeger et al., 2011b; Hofstetter et al., 2012). Les processus d'initiation de la minéralisation semblent favorisés aussi bien dans le traitement des pathologies bénignes que malignes. En complément à une minéralisation secondaire plus avancée favorisée par l'inhibition du remodelage, cet effet contribuerait à l'hyperminéralisation observée au niveau des maxillaires. De plus, cette stimulation de la minéralisation initiale pourrait en partie expliquer la diminution de la maturité minérale observée par des processus de minéralisation excessif rapide.

5.4 Intérêts et limites des modèles utilisés

L'objectif principal de nos travaux était de mettre en évidence les modifications moléculaires de composition et de structure du tissu osseux par les BP. Pour cela, nous avons choisi deux situations physiopathologiques de forte accumulation de BP : la néoformation osseuse chez le rat et l'étude de séquestres osseux d'ONM chez l'Homme.

Dans notre étude sur la néoformation, le modèle de défaut osseux au niveau du *calvarium* est connu et bien décrit dans la littérature que ce soit pour étudier les processus de réparation osseuse (Honma et al., 2008; Itagaki et al., 2008; Okata et al., 2013) ou pour tester des facteurs ou des matériaux améliorant la réparation osseuse (Chen et al., 2013; Nagata et al., 2009; Vigier et al., 2011). Ce modèle d'accès chirurgical simple, présente l'intérêt de s'affranchir des sollicitations mécaniques à la différence par exemple d'une localisation mandibulaire ou fémorale. Néanmoins, même en s'affranchissant de ces biais potentiels, nous avons retrouvés dans notre étude une hétérogénéité dans la cicatrisation entre individus. Pour pallier cette difficulté, nous avons évalué le « gain/perte relatif » des différents paramètres évalués par rapport à une valeur de référence à distance propre à chaque individu. Le design de notre étude avec le choix de zones à distance non marquées aux cyclines (soit de faible remodelage durant la fenêtre d'injection), a permis également d'utiliser cette valeur de référence à distance où l'action du Zol est minimisée. Cette méthode présente l'avantage majeur de quantifier l'effet qu'a eu le Zol sur la néoformation essentiellement.

D'autre part, nous avons privilégié dans cette étude une évaluation des effets du Zol sur la néoformation à court terme, en évitant une influence potentielle à plus long terme sur le remodelage et sur la maturation tissulaire. Nous avons mis en évidence des différences pour de fortes doses de Zol (équivalent malin), les effets restants inchangés pour la dose bénigne que ce soit en administration unique ou fractionnée. Au-delà de la dose, le moment d'injection est un facteur à considérer. Bien que l'apposition minérale augmente graduellement au cours des huit semaines de cicatrisation osseuse (Okata et al., 2013), la production collagénique par les ostéoblastes est maximum à deux semaines (Itagaki et al., 2008) et la quantité d'apposition minérale à quatre semaines de cicatrisation (Honma et al., 2008). Selon le moment de fixation lors de la néoformation osseuse, les BP pourraient influencer les mécanismes d'apposition et par conséquent les paramètres de maille du cristal apatitique ou l'organisation de la matrice collagénique de manière plus ou moins importante.

Dans l'étude des séquestres osseux d'ONM subsistent les problèmes d'hétérogénéité liés à l'inclusion des échantillons cliniques. En effet l'ONM est de survenue rare et d'expression clinique et radiologique hétérogène. De même, une hétérogénéité est observée dans les antécédents des patients, les molécules de BP utilisées, les durées de traitement et les médicaments adjuvants potentiels (corticoïdes…). Pour cela nous avons vérifié les variations observées dans le groupe test en scindant ce groupe selon la pathologie sous-jacente soit bénigne (ostéoporose) ou maligne (myélome ou métastases osseuses). Deux fois plus d'échantillons ont été collectés dans le groupe malin du fait de la survenue plus fréquente dans les pathologies avec le Zol (molécule majoritairement prescrite dans ce groupe) et/ou l'administration par voie intraveineuse (Almazrooa and Woo, 2009). Le groupe bénin est lui constitué d'échantillons ayant tous reçu de l'Aln par voie orale (Tableau 5, p. 49). La seule différence observé entre ces deux groupes concerne la minéralisation, tous les autres paramètres varient de manière significative de la même façon, et aucune différence significative entre les deux groupes n'a pu être observée dans notre étude.

L'imputabilité des conséquences physiopathologiques de la nécrose peut également être considérée et la dissociation de ces effets avec ceux de l'accumulation des BP est difficile. A ce jour, une seule étude a décrit les modifications physicochimiques dans le cas spécifique de l'ostéoradionécrose (Lakshmi et al., 2003). Cette étude reportait des modifications du compartiment organique et en particulier une absence de lipides

attribuée à l'hypocellularité spécifique à ce type d'ostéonécrose. La particularité de l'ostéoradionécrose rend la comparaison avec notre étude difficile. Par ailleurs, le compartiment minéral peut également être altéré suite à l'ostéonécrose liée aux BP où l'on décrit une apparence sclérotique et peu de travées osseuse (Marx et al., 2005; Vieillard et al., 2008). Les mesures de densité alvéolaire ont reporté une augmentation de la moyenne et de l'hétérogénéité de densité osseuse (Allen and Ruggiero, 2009) accompagnée d'une densité importante délimitant les lésions ostéonécrotiques (Takaishi et al., 2010). Les examens histologiques ont reporté la coexistence de différents tissus : les zones nécrotiques, l'os lamellaire résiduel, et des dépôts diffus d'os fibreux situés entre les ostéons (Bedogni et al., 2008; Favia et al., 2009). Un comblement par un os fibreux néoformé pourrait expliquer l'apparence sclérotique décrite à l'échelle macroscopique. Notre étude a plus spécifiquement été réalisée au niveau d'un tissu lamellaire préexistant soumis aux doses répétées de BP. L'hyperminéralisation observée peut donc être essentiellement attribuée à une minéralisation secondaire plus avancée par rapport à un os sain de remodelage physiologique fréquent, et donc plus jeune. Le rapport physiopathologique avec la nécrose environnante est difficile à préciser. Néanmoins, les résultats sur les modifications de structure sont cohérents avec les études portant sur les modifications osseuses de patientes ostéoporotiques sous l'effet d'un traitement par BP (Bala et al., 2011; Boskey et al., 2009; Gamsjaeger et al., 2011b).

CONCLUSION

Nos travaux indiquent que, dans des conditions de forte accumulation, les BP sont à l'origine de modifications importantes du contenu minéral du tissu osseux et provoquent des altérations structurales concernant les phases minérale et collagénique. En particulier, une hyperminéralisation est mise en évidence dans le contexte physiopathologique spécifique de l'ostéonécrose des maxillaires liée aux BP. Cette altération résulterait de processus de minéralisation secondaire avancés liés à l'inhibition du remodelage des maxillaires par les BP. Concernant les modifications structurales mises en évidence, elles semblent témoigner à la fois de l'inhibition du remodelage par les BP (séquestres osseux d'ONM), mais aussi de manière intéressante, elles peuvent être indépendantes des processus de remodelage et de maturation osseux (modèle de néoformation). En particulier, dans le cas des variations des paramètres de maille cristalline, elles confirment un effet direct des BP lié à la fixation/interaction au cristal apatitique. Dans le cas des variations structurales concernant la matrice collagénique, elles suggèrent une implication précoce des BP dans la mise en place et la stabilisation des fibrilles de collagène (modèle de néoformation). Cet effet, décrit pour la première fois, pourrait résulter d'une action des BP sur les cellules ostéoblastiques lors des processus de mise en place de la matrice collagénique au cours de la néoformation osseuse. La confirmation de ce résultat chez l'Homme et l'importance du timing d'administration au cours de la néoformation osseuse, serait bien entendu à préciser et nécessite des études complémentaires.

Ces résultats ouvrent également d'autres perspectives. En particulier, l'effet de site semble également un élément important à prendre en considération. Les résultats obtenus d'hyperminéralisation pourraient témoigner de la particularité des os maxillaires. Dans cette optique, des analyses chez le rat pour la modalité de traitement équivalente au dosage malin ont été initiées. Elles visent à mettre en évidence des différences dans les modifications physicochimiques selon le site osseux et l'influence du taux de remodelage. Les effets sur la qualité osseuse de l'os formé lors de remodelage seront recherchés. Enfin, l'impact physiopathologique et biomécanique de ses modifications de la qualité osseuse reste bien entendu à évaluer. A une échelle tissulaire, les variations d'homogénéité du tissu osseux induites par les BP devraient également avoir un impact biomécanique sur le comportement osseux global.

TABLE DES FIGURES

Figure 1 : Organisation structurale du tissu osseux de l'échelle macroscopique à l'échelle de l'ultrastructure : (a) pièce osseuse fémorale, (b) ostéons de l'os cortical, (c) travées de l'os trabéculaire, (d) os fibreux et sa trame collagénique peu organisée, (e) os lamellaire et faisceaux de fibres collagéniques en paquet dense, et (f) fibrille de collagène avec dépôt de cristaux phosphocalciques en aiguille (modifié d'après (Fratzl et al., 2004; Midura et al., 2007; Rho et al., 1998; Su et al., 2003)). 18

Figure 2 : L'agencement régulier de fibrilles de collagène avec une disposition en quinconce permet de guider la minéralisation : les cristaux apatitiques se déposent initialement dans les zones lacunaires entre les fibrilles et progresse le long de l'axe de ces fibrilles (Fratzl and Weinkamer, 2007). 19

Figure 3 : Formation, modifications post-traductionnelles et maturation du collagène (adapté d'après (Viguet-Carrin et al., 2006)). 21

Figure 4 : Différentes voies de formation des liaisons croisées formées à partir de l'hydroxyallysine (Eyre and Weis, 2013) 23

Figure 5 : Maille de l'hydroxyapatite avec, à gauche, la projection sur le plan de base et, à droite, la répartition des ions PO_4^{3-} et Ca^{2+} sur l'axe sénaire *c*. 26

Figure 6 : Maturation des apatites biologiques (Bala et al., 2012) 28

Figure 7 : Les différentes échelles d'évaluation de la qualité osseuse et les principales méthodes d'analyse associées (adapté d'après (Benhamou, 2007). RX : radiographie ; µCT : microtomographie assistée par ordinateur ; µRX : microradiographie quantitative ; FTIR : spectrométrie infrarouge par transformée de Fourier ; MEBE : microscopie électronique à balayage environnemental ; NMR : spectrométrie par résonnance magnétique ; HPLC : chromatographie liquide à haute pression 29

Figure 8 : Les différentes molécules de BP et leurs formules chimiques. Sont illustrés avec un cadre rouge les BP rencontrés dans notre travail et avec un double cadre rouge l'acide zoléronique Zol, BP testé dans notre modèle animal (adapté d'après (Russell, 2011)). 31

Figure 9 : Modélisation de la liaison/interaction des BP à l'HAP. La présence d'un groupe OH en R1 permet la liaison tridentée au Ca^{2+}, tandis qu'un atome d'azote

permettrait la formation d'une liaison N-H-O avec le groupement hydroxyle (d'après (Russell et al., 2008). 32

Figure 10 : Les différentes étapes chirurgicales de réalisation du défaut osseux : (a) site osseux situé sur la suture sagittale du *calvarium* de rat ; (b) positionnement de la pièce métallique préformée, (c) réalisation du défaut osseux de 4 mm ; et (d) repérage ultérieur du défaut osseux possible grâce aux mini-vis laissées en place. 43

Figure 11 : Protocole d'administration correspondant aux injections unique (S) ou multiples (M). Pour chaque série, les rats reçoivent du ZA ou du sérum en fonction du groupe. Les injections de calcéine et de déméclocycline correspondent respectivement aux flèches verte et orange..... 45

Figure 12 : Repérage macroscopique de la zone du défaut osseux cicatrisé : (a) sur l'échantillon inclus et (b) pour illustration sur la même zone radiographiée. La position des mini-vis permet de déterminer l'axe de coupe au centre du défaut osseux cicatrisé. 45

Figure 13 : Sélection de régions d'intérêt au niveau de l'os néoformé et l'os distant. La délimitation du défaut osseux initial est signifiée par une flèche sur les photos supérieures. Pour illustrer le choix et la transposition des régions d'intérêt, deux zones (A) et (B) sont sélectionnées respectivement au niveau de l'os néoformé et de l'os à distance (photos inférieures). A gauche, le marquage fluorescent aux cyclines permet l'identification des zones marquées de l'os néoformé et des zones non marquées de l'os à distance. Dans ces zones (A) et (B), un carré d'analyse de 25 × 25 µm correspondant aux régions d'intérêt est défini (carré noir des images (A) et (B)). A droite, les images réalisées aux MEBE illustrent la transposition de ces régions d'intérêt. Les mesures MEBE et Raman sont réalisées dans les mêmes régions d'intérêt. 46

Figure 14 : Echantillons cliniques : (A) séquestres d'ONM et (B) pièce anatomique de mandibule..... 48

Figure 15 : Organisation microscopique d'un séquestre d'ONM avec (A) la distinction de l'os lamellaire (pointe de flèche noire) et de l'os fibreux (pointe de flèche blanche). Le carré représente une zone d'intérêt d'organisation lamellaire (B) où nous avons effectué nos mesures sur la ligne d'analyse (flèche noire). 50

Figure 16 : Profil de distribution de la BMDD et les paramètres étudiés : le taux de Ca^{2+} est extrapolé à partir de la répartition des niveaux de gris par pourcentage de surface ; à

partir de cette courbe, les trois paramètres d'intérêt Ca_{MOYEN}, MaxFreq et Ca_{FWHM} sont calculés comme illustré. 52

Figure 17 : Spectre Raman du tissu osseux et les différentes bandes d'intérêt utilisées pour le calcul des paramètres physicochimiques. 57

Figure 18 : Variations dans le modèle de néoformation osseuse selon la modalité d'injection (S120, M120 et M600) des paramètres physicochimiques suivants : rapport minéral/organique, Ca_{MOYEN}, Ca_{FWHM}, MaxFreq, cristallinité, contenu en HPO_4, substitution de type B en CO_3, et rapport hydroxyproline/proline. Le gain est matérialisé par des valeurs positives et la perte par des valeurs négatives, et correspondent à x-fois la valeur brute de l'os distant. Le niveau de significativité *P* des différences significatives entre les groupes ZA et CTL est mentionné. 62

Figure 19 : Corrélation positive entre le rapport hydroxyproline/proline et la cristallinité pour la série M600 (groupes CTL et ZA). Pour illustration, les groupes CTL et ZA sont représentés par des sigles distinctifs. L'équation de la courbe, la valeur du R^2 et le niveau de significativité *P* sont indiqués. 66

Figure 20 : Corrélation négative entre le contenu en HPO_4 et le rapport minéral/organique pour la série M600 (groupes CTL et ZA). Pour illustration, les groupes CTL et ZA sont représentés par des sigles distinctifs. L'équation de la courbe, la valeur du R^2 et le niveau de significativité *P* sont indiqués. 66

Figure 21 : Comparaison des moyennes ± SD entre les groupes CTL et BP des paramètres Raman liés à la minéralisation : rapport minéral/organique et le contenu en PG. Le niveau de significativité *P* est mentionné. 67

Figure 22 : Comparaison des moyennes ± SD entre les groupes CTL et BP des paramètres Raman de cristallinité, du contenu en HPO_4 et de la substitution de type B en CO_3. Le niveau de significativité *P* est mentionné. 67

Figure 23 : Comparaison des moyennes ± SD entre les groupes CTL et BP des paramètres Raman liés à la minéralisation : rapport minéral/organique et le contenu en PG. Le niveau de significativité *P* est mentionné. 68

Figure 24 : Comparaison des moyennes ± SD entre les groupes CTL et BP des paramètres Raman de cristallinité, du contenu en HPO_4 et de la substitution de type B en CO_3. Le niveau de significativité *P* est mentionné. 68

Figure 25 : Corrélation négative entre le taux de substitution de type B en CO_3 et la durée de traitement des BP dans le groupe malin-BP. Un sigle distinctif représente la molécule de BP utilisée lors du traitement ou utilisée le plus longtemps en cas de traitement combiné. La valeur du R^2 et le niveau de significativité *P* sont indiqués..... 69

Figure 26 : Discrimination des groupes CTL et BP par l'analyse PLS-DA. Une valeur seuil représentée par la ligne discontinue délimite les spectres assignés au groupe CTL (au-dessus) de ceux assignés au group BP (en-dessous) à partir de la modélisation effectuée. Chaque spectre est représenté par un symbole propre au groupe auquel il appartient réellement..... 70

Figure 27 : Vecteur de régression calculé par l'analyse PLS-DA identifiant les bandes spectrales Raman discriminantes du groupe CTL (valeurs positives) ou du groupe BP (valeurs négatives). 71

Figure 28 : Spectres bruts Raman moyens des groupes CTL et BP. L'agrandissement montre le shift de bande du $\upsilon_1(PO_4)$ de 961 à 959cm^{-1} entre respectivement le groupe CTL et le groupe BP..... 71

TABLE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Les principales protéines non collagéniques, leurs proportions et leurs implications dans la physiologie osseuse..... 24

Tableau 2 : Gradation *in vitro* selon le degré d'affinité des différents BP. 35

Tableau 3 : Modifications moléculaires des BP dans les modèles animaux 38

Tableau 4 : Modifications moléculaires des BP chez l'Homme..... 39

Tableau 5 : Caractéristiques des patients (sexe, âge et pathologies) et du traitement par BP (types de molécule, durée de traitement) 49

Tableau 6 : Comparaisons des paramètres physico-chimiques entre les groupes ZA-S120 et ZA-M120, et entre les groupes CTL-S120 et CTL-M120. Les niveaux de significativité *P* des différences sont indiqués ; les différences significatives sont en caractère gras. . 64

Tableau 7 : Evaluation des différents paramètres après correction de l'âge : les comparaisons des moyennes sont effectuées entre respectivement le groupe ZA-M600 et les groupes ZA-S120 et ZA-M120, et le groupe CTL-M600 et les groupes CTL-S120 et CTL-M120. Les niveaux de significativité *P* des différences sont indiqués ; les différences significatives sont en caractère gras. 65

Tableau 8 : Scores de fiabilité (sensibilité et spécificité) et de robustesse (Root Mean Square Error Calibration, RMSEC et Root Mean Square Error Cross Validation, RMSECV) de l'analyse PLS-DA retenue. La fiabilité de l'analyse PLS-DA correspond à une sensibilité et une spécificité proche de 100 % ; la robustesse correspond à des valeurs de RMSEC et RMSECV voisines et se rapprochant au maximum de zéro..... 69

BIBLIOGRAPHIE

1. Adamczyk, M., Johnson, D.D., Reddy, R.E., 2001. Bone collagen cross-links: a convergent synthesis of (+)-deoxypyrrololine. J. Org. Chem. 66, 11–19.

2. Akkus, O., Polyakova-Akkus, A., Adar, F., Schaffler, M.B., 2003. Aging of microstructural compartments in human compact bone. J Bone Min. Res 18, 1012–1019.

3. Allen, M.R., Gineyts, E., Leeming, D.J., Burr, D.B., Delmas, P.D., 2008. Bisphosphonates alter trabecular bone collagen cross-linking and isomerization in beagle dog vertebra. Osteoporos Int 19, 329–337.

4. Allen, M.R., Kubek, D.J., Burr, D.B., 2010. Cancer treatment dosing regimens of zoledronic acid result in near-complete suppression of mandible intracortical bone remodeling in beagle dogs. J Bone Min. Res 25, 98–105.

5. Allen, M.R., Kubek, D.J., Burr, D.B., Ruggiero, S.L., Chu, T.-M.G., 2011. Compromised osseous healing of dental extraction sites in zoledronic acid-treated dogs. Osteoporos Int 22, 693–702.

6. Allen, M.R., Ruggiero, S.L., 2009. Higher bone matrix density exists in only a subset of patients with bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. J. Oral Maxillofac. Surg. Off. J. Am. Assoc. Oral Maxillofac. Surg. 67, 1373–1377.

7. Almazrooa, S.A., Woo, S.-B., 2009. Bisphosphonate and nonbisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw: a review. J Am Dent Assoc 140, 864–875.

8. Almora-Barrios, N., Austen, K.F., de Leeuw, N.H., 2009. Density functional theory study of the binding of glycine, proline, and hydroxyproline to the hydroxyapatite (0001) and (0110) surfaces. Langmuir ACS J. Surf. Colloids 25, 5018–5025.

9. Anastasia, L., Rota, P., Anastasia, M., Allevi, P., 2013. Chemical structure, biosynthesis and synthesis of free and glycosylated pyridinolines formed by cross-link of bone and synovium collagen. Org. Biomol. Chem. 11, 5747–5771.

10. Bala, Y., Farlay, D., Boivin, G., 2012. Bone mineralization: from tissue to crystal in normal and pathological contexts. Osteoporos Int. 24,2153–2166.

11. Bala, Y., Depalle, B., Farlay, D., Douillard, T., Meille, S., Follet, H., Chapurlat, R., Chevalier, J., Boivin, G., 2012. Bone micromechanical properties are compromised during long-term alendronate therapy independently of mineralization. J Bone Min. Res 27, 825–834.

12. Bala, Y., Farlay, D., Chapurlat, R.D., Boivin, G., 2011. Modifications of bone material properties in postmenopausal osteoporotic women long-term treated with alendronate. Eur J Endocrinol 165, 647–655.

13. Basso, F.G., Turrioni, A.P.S., Hebling, J., de Souza Costa, C.A., 2013. Effects of zoledronic acid on odontoblast-like cells. Arch. Oral Biol. 58, 467–473.

14. Bedogni, A., Blandamura, S., Lokmic, Z., Palumbo, C., Ragazzo, M., Ferrari, F., Tregnaghi, A., Pietrogrande, F., Procopio, O., Saia, G., Ferretti, M., Bedogni, G., Chiarini, L., Ferronato, G., Ninfo, V., Lo Russo, L., Lo Muzio, L., Nocini, P.F., 2008. Bisphosphonate-associated jawbone osteonecrosis: a correlation between imaging techniques and histopathology. Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod. 105, 358–364.

15. Bella, J., Brodsky, B., Berman, H.M., 1995. Hydration structure of a collagen peptide. Struct. Lond. Engl. 3, 893–906.

16. Benhamou, C.-L., 2007. Effects of osteoporosis medications on bone quality. Jt. Bone Spine Rev. Rhum. 74, 39–47.

17. Bi, X., Patil, C.A., Lynch, C.C., Pharr, G.M., Mahadevan-Jansen, A., Nyman, J.S., 2011. Raman and mechanical properties correlate at whole bone- and tissue-levels in a genetic mouse model. J. Biomech. 44, 297–303.

18. Biver, E., Vieillard, M.H., Cortet, B., Salleron, J., Falgayrac, G., Penel, G., 2010. No anti-angiogenic effect of clinical dosing regimens of a single zoledronic acid injection in an experimental bone healing site. Bone 46, 643–648.

19. Bohic, S., Rey, C., Legrand, A., Sfihi, H., Rohanizadeh, R., Martel, C., Barbier, A., Daculsi, G., 2000. Characterization of the trabecular rat bone mineral: effect of ovariectomy and bisphosphonate treatment. Bone 26, 341–348.

20. Boivin, G., Meunier, P.J., 2002. Effects of bisphosphonates on matrix mineralization. J. Musculoskelet. Neuronal Interact. 2, 538–543.

21. Boivin, G.Y., Chavassieux, P.M., Santora, A.C., Yates, J., Meunier, P.J., 2000. Alendronate increases bone strength by increasing the mean degree of mineralization of bone tissue in osteoporotic women. Bone 27, 687–694.

22. Boskey A, 2003. Bone mineral crystal size. Osteoporos. Int. 14 Suppl 5, S16–20; discussion S20–21.

23. Boskey, A.L., DiCarlo, E., Paschalis, E., West, P., Mendelsohn, R., 2005. Comparison of mineral quality and quantity in iliac crest biopsies from high- and low-turnover osteoporosis: an FT-IR microspectroscopic investigation. Osteoporos Int 16, 2031–2038.

24. Boskey, A.L., Spevak, L., Weinstein, R.S., 2009. Spectroscopic markers of bone quality in alendronate-treated postmenopausal women. Osteoporos Int 20, 793–800.

25. Buckley, K., Matousek, P., Parker, A.W., Goodship, A.E., 2012. Raman spectroscopy reveals differences in collagen secondary structure which relate to the levels of mineralisation in bones that have evolved for different functions. J. Raman Spectrosc. 43, 1237–1243.

26. Buckwalter, J.A., Glimcher, M.J., Cooper, R.R., Recker, R., 1996. Bone biology. I: Structure, blood supply, cells, matrix, and mineralization. Instr. Course Lect. 45, 371–386.

27. Burket, J., Gourion-Arsiquaud, S., Havill, L.M., Baker, S.P., Boskey, A.L., van der Meulen, M.C.H., 2011. Microstructure and nanomechanical properties in osteons relate to tissue and animal age. J Biomech 44, 277–284.

28. Burket, J.C., Brooks, D.J., MacLeay, J.M., Baker, S.P., Boskey, A.L., van der Meulen, M.C.H., 2013. Variations in nanomechanical properties and tissue composition within trabeculae from an ovine model of osteoporosis and treatment. Bone 52, 326–336.

29. Burr, D.B., Miller, L., Grynpas, M., Li, J., Boyde, A., Mashiba, T., Hirano, T., Johnston, C.C., 2003. Tissue mineralization is increased following 1-year treatment with high doses of bisphosphonates in dogs. Bone 33, 960–969.

30. Calton, E.F., Macleay, J., Boskey, A.L., 2011. Fourier transform infrared imaging analysis of cancellous bone in alendronate- and raloxifene-treated osteopenic sheep. Cells Tissues Organs 194, 302–306.

31. Camacho, N.P., Carroll, P., Raggio, C.L., 2003. Fourier transform infrared imaging spectroscopy (FT-IRIS) of mineralization in bisphosphonate-treated oim/oim mice. Calcif. Tissue Int. 72, 604–609.

32. Carden, A., Morris, M.D., 2000. Application of vibrational spectroscopy to the study of mineralized tissues (review). J. Biomed. Opt. 5, 259–268.

33. Cazalbou, S., Combes, C., Eichert, D., Rey, C., Glimcher, M.J., 2004. Poorly crystalline apatites: evolution and maturation in vitro and in vivo. J. Bone Miner. Metab. 22, 310–317.

34. Chavassieux, P.M., Arlot, M.E., Reda, C., Wei, L., Yates, A.J., Meunier, P.J., 1997. Histomorphometric assessment of the long-term effects of alendronate on bone quality and remodeling in patients with osteoporosis. J. Clin. Invest. 100, 1475–1480.

35. Chen, C., Xia, M., Wu, L., Zhou, C., Wang, F., 2012a. Modeling the interaction of seven bisphosphonates with the hydroxyapatite(100) face. J. Mol. Model. 18, 4007–4012.

36. Chen, W., Liu, J., Manuchehrabadi, N., Weir, M.D., Zhu, Z., Xu, H.H.K., 2013. Umbilical cord and bone marrow mesenchymal stem cell seeding on macroporous calcium phosphate for bone regeneration in rat cranial defects. Biomaterials 34, 9917–9925.

37. Coxon, F.P., Thompson, K., Roelofs, A.J., Ebetino, F.H., Rogers, M.J., 2008. Visualizing mineral binding and uptake of bisphosphonate by osteoclasts and non-resorbing cells. Bone 42, 848–860.

38. Cremers, S., Papapoulos, S., 2011. Pharmacology of bisphosphonates. Bone 49, 42–49.

39. Donnelly, E., Boskey, A.L., Baker, S.P., van der Meulen, M.C.H., 2010. Effects of tissue age on bone tissue material composition and nanomechanical properties in the rat cortex. J Biomed Mater Res A 92, 1048–1056.

40. Donnelly, E., Meredith, D.S., Nguyen, J.T., Gladnick, B.P., Rebolledo, B.J., Shaffer, A.D., Lorich, D.G., Lane, J.M., Boskey, A.L., 2012. Reduced cortical bone compositional heterogeneity with bisphosphonate treatment in postmenopausal women with intertrochanteric and subtrochanteric fractures. J Bone Min. Res 27, 672–678.

41. Duraipandian, S., Zheng, W., Ng, J., Low, J.J.H., Ilancheran, A., Huang, Z., 2011. In vivo diagnosis of cervical precancer using Raman spectroscopy and genetic algorithm techniques. Analyst 136, 4328–4336.

42. Durchschlag, E., Paschalis, E.P., Zoehrer, R., Roschger, P., Fratzl, P., Recker, R., Phipps, R., Klaushofer, K., 2006. Bone material properties in trabecular bone from human iliac crest biopsies after 3- and 5-year treatment with risedronate. J Bone Min. Res 21, 1581–1590.

43. Ebetino, F., Barnett, B.L., Russell, R.G., 2005. A Computational Model Delineates Differences in Hydroxyapatite Binding Affinities of Bisphosphonates in Clinical Use. J. Bone Miner. Res. 20, S259.

44. Ebetino, F.H., Hogan, A.-M.L., Sun, S., Tsoumpra, M.K., Duan, X., Triffitt, J.T., Kwaasi, A.A., Dunford, J.E., Barnett, B.L., Oppermann, U., Lundy, M.W., Boyde, A., Kashemirov, B.A., McKenna, C.E., Russell, R.G.G., 2011. The relationship between the chemistry and biological activity of the bisphosphonates. Bone, Bisphosphonates 49, 20–33.

45. Elliot, J.C., 1994. Structure and chemistry of the apatites and other calcium orthophosphates, Studies in inorganic chemistry. Elsevier Science B.V., Amsterdam, Netherlands.

46. Eyre, D.R., Dickson, I.R., Van Ness, K., 1988. Collagen cross-linking in human bone and articular cartilage. Age-related changes in the content of mature hydroxypyridinium residues. Biochem. J. 252, 495–500.

47. Eyre, D.R., Weis, M.A., 2013. Bone collagen: new clues to its mineralization mechanism from recessive osteogenesis imperfecta. Calcif. Tissue Int. 93, 338–347.

48. Eyre, D.R., Wu, J.-J., 2005. Collagen Cross-Links, in: Brinckmann, J., Notbohm, H., Müller, P.K. (Eds.), Collagen, Topics in Current Chemistry. Springer Berlin Heidelberg, pp. 207–229.

49. Fantner, G.E., Hassenkam, T., Kindt, J.H., Weaver, J.C., Birkedal, H., Pechenik, L., Cutroni, J.A., Cidade, G.A.G., Stucky, G.D., Morse, D.E., Hansma, P.K., 2005. Sacrificial bonds and hidden length dissipate energy as mineralized fibrils separate during bone fracture. Nat. Mater. 4, 612–616.

50. Farlay, D., Panczer, G., Rey, C., Delmas, P.D., Boivin, G., 2010. Mineral maturity and crystallinity index are distinct characteristics of bone mineral. J Bone Min. Metab 28, 433–445.

51. Favia, G., Pilolli, G.P., Maiorano, E., 2009. Histologic and histomorphometric features of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws: an analysis of 31 cases with confocal laser scanning microscopy. Bone 45, 406–413.

52. Fleisch, H., Russell, R.G., Straumann, F., 1966. Effect of pyrophosphate on hydroxyapatite and its implications in calcium homeostasis. Nature 212, 901–903.

53. Follet, H., Boivin, G., Rumelhart, C., Meunier, P.J., 2004. The degree of mineralization is a determinant of bone strength: a study on human calcanei. Bone 34, 783–789.

54. Fratzl, P., Gupta, H.S., Paschalis, E.P., Roschger, P., 2004. Structure and mechanical quality of the collagen–mineral nano-composite in bone. J. Mater. Chem. 14, 2115–2123.

55. Fratzl, P., Weinkamer, R., 2007. Nature's hierarchical materials. Prog. Mater. Sci. 52, 1263–1334.

56. Frediani, B., Spreafico, A., Capperucci, C., Chellini, F., Gambera, D., Ferrata, P., Baldi, F., Falsetti, P., Santucci, A., Bocchi, L., Marcolongo, R., 2004. Long-term effects of neridronate on human osteoblastic cell cultures. Bone 35, 859–869.

57. Fuchs, R.K., Faillace, M.E., Allen, M.R., Phipps, R.J., Miller, L.M., Burr, D.B., 2011. Bisphosphonates do not alter the rate of secondary mineralization. Bone 49, 701–705.

58. Gamsjaeger, S., Brozek, W., Recker, R., Klaushofer, K., Paschalis, E.P., 2014. Transmenopausal changes in trabecular bone quality. J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res. 29, 608–617.

59. Gamsjaeger, S., Buchinger, B., Zoehrer, R., Phipps, R., Klaushofer, K., Paschalis, E.P., 2011a. Effects of one year daily teriparatide treatment on trabecular bone material properties in postmenopausal osteoporotic women previously treated with alendronate or risedronate. Bone 49, 1160–1165.

60. Gamsjaeger, S., Buchinger, B., Zwettler, E., Recker, R., Black, D., Gasser, J.A., Eriksen, E.F., Klaushofer, K., Paschalis, E.P., 2011b. Bone material properties in actively bone-forming trabeculae in postmenopausal women with osteoporosis after three years of treatment with once-yearly Zoledronic acid. J Bone Min. Res 26, 12–18.

61. Gamsjaeger, S., Hofstetter, B., Zwettler, E., Recker, R., Gasser, J.A., Eriksen, E.F., Klaushofer, K., Paschalis, E.P., 2013. Effects of 3 years treatment with once-yearly zoledronic acid on the kinetics of bone matrix maturation in osteoporotic patients. Osteoporos Int 24, 339–347.

62. Geoffroy, V., Paschalis, E.P., Libouban, H., Blouin, S., Ostertag, A., Chappard, D., Cros, M., Phipps, R., de Vernejoul, M.-C., 2011. Effects of risedronate in Runx2 overexpressing mice, an animal model for evaluation of treatment effects on bone quality and fractures. Calcif. Tissue Int. 88, 464–475.

63. Gibson, L.J., 1985. The mechanical behaviour of cancellous bone. J. Biomech. 18, 317–328.

64. Goodyear, S.R., Gibson, I.R., Skakle, J.M.S., Wells, R.P.K., Aspden, R.M., 2009. A comparison of cortical and trabecular bone from C57 Black 6 mice using Raman spectroscopy. Bone 44, 899–907.

65. Gordon, M.K., Hahn, R.A., 2010. Collagens. Cell Tissue Res. 339, 247–257.

66. Gourion-Arsiquaud, S., Allen, M.R., Burr, D.B., Vashishth, D., Tang, S.Y., Boskey, A.L., 2010. Bisphosphonate treatment modifies canine bone mineral and matrix properties and their heterogeneity. Bone 46, 666–672.

67. Gourion-Arsiquaud, S., Burket, J.C., Havill, L.M., DiCarlo, E., Doty, S.B., Mendelsohn, R., van der Meulen, M.C.H., Boskey, A.L., 2009. Spatial variation in osteonal bone properties relative to tissue and animal age. J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res. 24, 1271–1281.

68. Gupta, H.S., Seto, J., Wagermaier, W., Zaslansky, P., Boesecke, P., Fratzl, P., 2006. Cooperative deformation of mineral and collagen in bone at the nanoscale. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 103, 17741–17746.

69. Hanschin, R.G., Stern, W.B., 1995. X-ray diffraction studies on the lattice perfection of human bone apatite (Crista iliaca). Bone 16, 355S–363S.

70. Hengsberger, S., Kulik, A., Zysset, P., 2002. Nanoindentation discriminates the elastic properties of individual human bone lamellae under dry and physiological conditions. Bone 30, 178–184.

71. Henneman, Z.J., Nancollas, G.H., Ebetino, F.H., Russell, R.G.G., Phipps, R.J., 2008. Bisphosphonate binding affinity as assessed by inhibition of carbonated apatite dissolution in vitro. J. Biomed. Mater. Res. A 85, 993–1000.

72. Heymann, D., Ory, B., Blanchard, F., Heymann, M.-F., Coipeau, P., Charrier, C., Couillaud, S., Thiery, J.P., Gouin, F., Redini, F., 2005. Enhanced tumor regression and tissue repair when zoledronic acid is combined with ifosfamide in rat osteosarcoma. Bone 37, 74–86.

73. Hofstetter, B., Gamsjaeger, S., Phipps, R.J., Recker, R.R., Ebetino, F.H., Klaushofer, K., Paschalis, E.P., 2012. Effects of alendronate and risedronate on bone material properties in actively forming trabecular bone surfaces. J Bone Min. Res 27, 995–1003.

74. Hokugo, A., Sun, S., Park, S., McKenna, C.E., Nishimura, I., 2013. Equilibrium-dependent bisphosphonate interaction with crystalline bone mineral explains anti-resorptive pharmacokinetics and prevalence of osteonecrosis of the jaw in rats. Bone 53, 59–68.

75. Honma, T., Itagaki, T., Nakamura, M., Kamakura, S., Takahashi, I., Echigo, S., Sasano, Y., 2008. Bone formation in rat calvaria ceases within a limited period regardless of completion of defect repair. Oral Dis. 14, 457–464.

76. Huja, S.S., Mason, A., Fenell, C.E., Mo, X., Hueni, S., D'Atri, A.M., Fernandez, S.A., 2011. Effects of short-term zoledronic acid treatment on bone remodeling and healing at surgical sites in the maxilla and mandible of aged dogs. J Oral Maxillofac Surg 69, 418–427.

77. Ironside, M.S., Duer, M.J., Reid, D.G., Byard, S., 2010. Bisphosphonate protonation states, conformations, and dynamics on bone mineral probed by solid-state NMR without isotope enrichment. Eur. J. Pharm. Biopharm. Off. J. Arbeitsgemeinschaft Für Pharm. Verfahrenstechnik EV 76, 120–126.

78. Isaksson, H., Turunen, M.J., Rieppo, L., Saarakkala, S., Tamminen, I.S., Rieppo, J., Kröger, H., Jurvelin, J.S., 2010. Infrared spectroscopy indicates altered bone turnover and remodeling activity in renal osteodystrophy. J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res. 25, 1360–1366.

79. Itagaki, T., Honma, T., Takahashi, I., Echigo, S., Sasano, Y., 2008. Quantitative analysis and localization of mRNA transcripts of type I collagen, osteocalcin, MMP 2, MMP 8, and MMP 13 during bone healing in a rat calvarial experimental defect model. Anat. Rec. Hoboken NJ 2007 291, 1038–1046.

80. Jahnke, W., Henry, C., 2010. An in vitro assay to measure targeted drug delivery to bone mineral. ChemMedChem 5, 770–776.

81. Josse, S., Faucheux, C., Soueidan, A., Grimandi, G., Massiot, D., Alonso, B., Janvier, P., Laïb, S., Pilet, P., Gauthier, O., Daculsi, G., Guicheux, J.J., Bujoli, B., Bouler, J.-M., 2005. Novel biomaterials for bisphosphonate delivery. Biomaterials 26, 2073–2080.

82. Juillard, A., Falgayrac, G., Cortet, B., Vieillard, M.-H., Azaroual, N., Hornez, J.-C., Penel, G., 2010. Molecular interactions between zoledronic acid and bone: An in vitro Raman microspectroscopic study. Bone 47, 895–904.

83. Kaiser, T., Teufel, I., Geiger, K., Vater, Y., Aicher, W.K., Klein, G., Fehm, T., 2013. Bisphosphonates modulate vital functions of human osteoblasts and affect their interactions with breast cancer cells. Breast Cancer Res. Treat. 140, 35–48.

84. Karampas, I.A., Orkoula, M.G., Kontoyannis, C.G., 2013. A quantitative bioapatite/collagen calibration method using Raman spectroscopy of bone. J. Biophotonics 6, 573–586.

85. Kavanagh, K.L., Guo, K., Dunford, J.E., Wu, X., Knapp, S., Ebetino, F.H., Rogers, M.J., Russell, R.G.G., Oppermann, U., 2006. The molecular mechanism of nitrogen-containing bisphosphonates as antiosteoporosis drugs. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 103, 7829–7834.

86. Kazanci, M., Fratzl, P., Klaushofer, K., Paschalis, E.P., 2006. Complementary information on in vitro conversion of amorphous (precursor) calcium phosphate to hydroxyapatite from Raman microspectroscopy and wide-angle X-ray scattering. Calcif Tissue Int 79, 354–359.

87. Kazanci, M., Wagner, H.D., Manjubala, N.I., Gupta, H.S., Paschalis, E., Roschger, P., Fratzl, P., 2007. Raman imaging of two orthogonal planes within cortical bone. Bone 41, 456–461.

88. Keene, D.R., San Antonio, J.D., Mayne, R., McQuillan, D.J., Sarris, G., Santoro, S.A., Iozzo, R.V., 2000. Decorin binds near the C terminus of type I collagen. J. Biol. Chem. 275, 21801–21804.

89. Kim, C.W., Yun, Y.-P., Lee, H.J., Hwang, Y.-S., Kwon, I.K., Lee, S.C., 2010. In situ fabrication of alendronate-loaded calcium phosphate microspheres: controlled release for inhibition of osteoclastogenesis. J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc. 147, 45–53.

90. Koch, F.P., Yekta, S.S., Merkel, C., Ziebart, T., Smeets, R., 2010. The impact of bisphosphonates on the osteoblast proliferation and Collagen gene expression in vitro. Head Face Med. 6, 12.

91. Krane, S.M., 2008. The importance of proline residues in the structure, stability and susceptibility to proteolytic degradation of collagens. Amino Acids 35, 703–710.

92. Lakshmi, R.J., Alexander, M., Kurien, J., Mahato, K.K., Kartha, V.B., 2003. Osteoradionecrosis (ORN) of the mandible: a laser Raman spectroscopic study. Appl Spectrosc 57, 1100–1116.

93. Lamoureux, F., Baud'huin, M., Duplomb, L., Heymann, D., Rédini, F., 2007. Proteoglycans: key partners in bone cell biology. BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol. 29, 758–771.

94. Landis, W.J., 1999. An overview of vertebrate mineralization with emphasis on collagen-mineral interaction. Gravitational Space Biol. Bull. Publ. Am. Soc. Gravitational Space Biol. 12, 15–26.

95. Landis, W.J., Silver, F.H., 2009. Mineral deposition in the extracellular matrices of vertebrate tissues: identification of possible apatite nucleation sites on type I collagen. Cells Tissues Organs 189, 20–24.

96. Lawson, M.A., Xia, Z., Barnett, B.L., Triffitt, J.T., Phipps, R.J., Dunford, J.E., Locklin, R.M., Ebetino, F.H., Russell, R.G.G., 2010. Differences between bisphosphonates in binding affinities for hydroxyapatite. J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater. 92, 149–155.

97. Lennart, E., Johansson, E., Kettaneh-Wold, N., Halse, J., Wikström, C., Svante, W., 2006. Multi- and Megavariate Data Analysis Basic Principles and Applications (Part I).

98. Leu, C.-T., Luegmayr, E., Freedman, L.P., Rodan, G.A., Reszka, A.A., 2006. Relative binding affinities of bisphosphonates for human bone and relationship to antiresorptive efficacy. Bone 38, 628–636.

99. Marx, R.E., Sawatari, Y., Fortin, M., Broumand, V., 2005. Bisphosphonate-induced exposed bone (osteonecrosis/osteopetrosis) of the jaws: risk factors, recognition, prevention, and treatment. J Oral Maxillofac Surg 63, 1567–1575.

100. McCreadie, B.R., Morris, M.D., Chen, T.-C., Sudhaker Rao, D., Finney, W.F., Widjaja, E., Goldstein, S.A., 2006. Bone tissue compositional differences in women with and without osteoporotic fracture. Bone 39, 1190–1195.

101. Midura, R.J., Vasanji, A., Su, X., Midura, S.B., Gorski, J.P., 2009. Isolation of calcospherulites from the mineralization front of bone. Cells Tissues Organs 189, 75–79.

102. Midura, R.J., Vasanji, A., Su, X., Wang, A., Midura, S.B., Gorski, J.P., 2007. Calcospherulites isolated from the mineralization front of bone induce the mineralization of type I collagen. Bone 41, 1005–1016.

103. Misof, B.M., Patsch, J.M., Roschger, P., Muschitz, C., Gamsjaeger, S., Paschalis, E.P., Prokop, E., Klaushofer, K., Pietschmann, P., Resch, H., 2014. Intravenous treatment with ibandronate normalizes bone matrix mineralization and reduces cortical porosity after two years in male osteoporosis: a paired biopsy study. J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res. 29, 440–449.

104. Misof, B.M., Roschger, P., Gabriel, D., Paschalis, E.P., Eriksen, E.F., Recker, R.R., Gasser, J.A., Klaushofer, K., 2013. Annual intravenous zoledronic acid for three years increased cancellous bone matrix mineralization beyond normal values in the HORIZON biopsy cohort. J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res. 28, 442–448.

105. Mochida, Y., Parisuthiman, D., Pornprasertsuk-Damrongsri, S., Atsawasuwan, P., Sricholpech, M., Boskey, A.L., Yamauchi, M., 2009. Decorin modulates collagen matrix assembly and mineralization. Matrix Biol 28, 44–52.

106. Monier-Faugere, M.C., Geng, Z., Paschalis, E.P., Qi, Q., Arnala, I., Bauss, F., Boskey, A.L., Malluche, H.H., 1999. Intermittent and continuous administration of the bisphosphonate ibandronate in ovariohysterectomized beagle dogs: effects on bone morphometry and mineral properties. J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res. 14, 1768–1778.

107. Morris, M.D., Mandair, G.S., 2011. Raman assessment of bone quality. Clin Orthop Relat Res 469, 2160–2169.

108. Mukherjee, S., Song, Y., Oldfield, E., 2008. NMR investigations of the static and dynamic structures of bisphosphonates on human bone: a molecular model. J. Am. Chem. Soc. 130, 1264–1273.

109. Nagata, M., Messora, M., Okamoto, R., Campos, N., Pola, N., Esper, L., Sbrana, M., Fucini, S., Garcia, V., Bosco, A., 2009. Influence of the proportion of particulate autogenous bone graft/platelet-rich plasma on bone healing in critical-size defects: an immunohistochemical analysis in rat calvaria. Bone 45, 339–345.

110. Nancollas, G.H., Tang, R., Phipps, R.J., Henneman, Z., Gulde, S., Wu, W., Mangood, A., Russell, R.G.G., Ebetino, F.H., 2006. Novel insights into actions of bisphosphonates on bone: differences in interactions with hydroxyapatite. Bone 38, 617–627.

111. Neame, P.J., Kay, C.J., McQuillan, D.J., Beales, M.P., Hassell, J.R., 2000. Independent modulation of collagen fibrillogenesis by decorin and lumican. Cell. Mol. Life Sci. CMLS 57, 859–863.

112. Okata, H., Nakamura, M., Henmi, A., Yamaguchi, S., Mikami, Y., Shimauchi, H., Sasano, Y., 2013. Calcification during bone healing in a standardised rat calvarial defect assessed by micro-CT and SEM-EDX. Oral Dis. [Epub ahead of print]

113. Olejnik, C., Falgayrac, G., During, A., Penel, G., 2011. Compatibility of fluorochrome labeling protocol with Raman spectroscopy to study bone formation. Bull. Groupèment Int. Pour Rech. Sci. En Stomatol. Odontol. 50, 34–36.

114. Olejnik, C., Falgayrac, G., During, A., Vieillard, M.H., Maes, J.M., Cortet, B., Penel, G., 2014. Molecular alterations of bone quality in sequesters of bisphosphonates-related osteonecrosis of the jaws. Osteoporos. Int. 25, 747–756.

115. Otomo, H., Sakai, A., Ikeda, S., Tanaka, S., Ito, M., Phipps, R.J., Nakamura, T., 2004. Regulation of mineral-to-matrix ratio of lumbar trabecular bone in ovariectomized rats treated with risedronate in combination with or without vitamin K2. J. Bone Miner. Metab. 22, 404–414.

116. Pan, B., To, L.B., Farrugia, A.N., Findlay, D.M., Green, J., Gronthos, S., Evdokiou, A., Lynch, K., Atkins, G.J., Zannettino, A.C.W., 2004. The nitrogen-containing bisphosphonate, zoledronic acid, increases mineralisation of human bone-derived cells in vitro. Bone 34, 112–123.

117. Pascaud, P., Gras, P., Coppel, Y., Rey, C., Sarda, S., 2013. Interaction between a bisphosphonate, tiludronate, and biomimetic nanocrystalline apatites. Langmuir ACS J. Surf. Colloids 29, 2224–2232.

118. Paschalis, E.P., DiCarlo, E., Betts, F., Sherman, P., Mendelsohn, R., Boskey, A.L., 1996. FTIR microspectroscopic analysis of human osteonal bone. Calcif. Tissue Int. 59, 480–487.

119. Pautke, C., Vogt, S., Kreutzer, K., Haczek, C., Wexel, G., Kolk, A., Imhoff, A.B., Zitzelsberger, H., Milz, S., Tischer, T., 2010. Characterization of eight different tetracyclines: advances in fluorescence bone labeling. J. Anat. 217, 76–82.

120. Pautke, C., Vogt, S., Tischer, T., Wexel, G., Deppe, H., Milz, S., Schieker, M., Kolk, A., 2005. Polychrome labeling of bone with seven different fluorochromes: enhancing fluorochrome discrimination by spectral image analysis. Bone 37, 441–445.

121. Plotkin, L.I., Manolagas, S.C., Bellido, T., 2006. Dissociation of the pro-apoptotic effects of bisphosphonates on osteoclasts from their anti-apoptotic effects on osteoblasts/osteocytes with novel analogs. Bone 39, 443–452.

122. Portero-Muzy, N.R., Chavassieux, P.M., Bouxsein, M.L., Gineyts, E., Garnero, P., Chapurlat, R.D., 2012. Early effects of zoledronic acid and teriparatide on bone microarchitecture, remodeling and collagen crosslinks: comparison between iliac crest and lumbar vertebra in ewes. Bone 51, 714–719.

123. Reid, I.R., Bolland, M.J., Grey, A.B., 2007. Is bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw caused by soft tissue toxicity? Bone 41, 318–320.

124. Reinholz, G.G., Getz, B., Pederson, L., Sanders, E.S., Subramaniam, M., Ingle, J.N., Spelsberg, T.C., 2000. Bisphosphonates directly regulate cell proliferation, differentiation, and gene expression in human osteoblasts. Cancer Res. 60, 6001–6007.

125. Reszka, A.A., Rodan, G.A., 2003. Mechanism of action of bisphosphonates. Curr Osteoporos Rep 1, 45–52.

126. Rey, C., Combes, C., Drouet, C., Glimcher, M.J., 2009. Bone mineral: update on chemical composition and structure. Osteoporos Int 20, 1013–1021.

127. Rey, C., Combes, C., Drouet, C., Sfihi, H., Barroug, A., 2007. Physico-chemical properties of nanocrystalline apatites: Implications for biominerals and biomaterials. Mater. Sci. Eng. C, Symposium A: Advanced Biomaterials International Conference on Materials for Advanced Technologies (ICMAT 2005) 27, 198–205.

128. Reznikov, N., Shahar, R., Weiner, S., 2014. Three-dimensional structure of human lamellar bone: the presence of two different materials and new insights into the hierarchical organization. Bone 59, 93–104.

129. Rho, J.-Y., Kuhn-Spearing, L., Zioupos, P., 1998. Mechanical properties and the hierarchical structure of bone. Med. Eng. Phys. 20, 92–102.

130. Roelofs, A.J., Stewart, C.A., Sun, S., Błażewska, K.M., Kashemirov, B.A., McKenna, C.E., Russell, R.G.G., Rogers, M.J., Lundy, M.W., Ebetino, F.H., Coxon, F.P., 2012. Influence of bone affinity on the skeletal distribution of fluorescently labeled bisphosphonates in vivo. J. Bone Miner. Res. 27, 835–847.

131. Rogers, M.J., Crockett, J.C., Coxon, F.P., Mönkkönen, J., 2011. Biochemical and molecular mechanisms of action of bisphosphonates. Bone, Bisphosphonates 49, 34–41.

132. Rondeau, J.-M., Bitsch, F., Bourgier, E., Geiser, M., Hemmig, R., Kroemer, M., Lehmann, S., Ramage, P., Rieffel, S., Strauss, A., Green, J.R., Jahnke, W., 2006. Structural basis for the exceptional in vivo efficacy of bisphosphonate drugs. ChemMedChem 1, 267–273.

133. Roschger, P., Fratzl, P., Eschberger, J., Klaushofer, K., 1998. Validation of quantitative backscattered electron imaging for the measurement of mineral density distribution in human bone biopsies. Bone 23, 319–326.

134. Roschger, P., Lombardi, A., Misof, B.M., Maier, G., Fratzl-Zelman, N., Fratzl, P., Klaushofer, K., 2010. Mineralization density distribution of postmenopausal osteoporotic bone is restored to normal after long-term alendronate treatment: qBEI and sSAXS data from the fracture intervention trial long-term extension (FLEX). J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res. 25, 48–55.

135. Roschger, P., Paschalis, E.P., Fratzl, P., Klaushofer, K., 2008. Bone mineralization density distribution in health and disease. Bone 42, 456–466.

136. Roschger, P., Rinnerthaler, S., Yates, J., Rodan, G.A., Fratzl, P., Klaushofer, K., 2001. Alendronate increases degree and uniformity of mineralization in cancellous bone and decreases the porosity in cortical bone of osteoporotic women. Bone 29, 185–191.

137. Russell, R.G., Mühlbauer, R.C., Bisaz, S., Williams, D.A., Fleisch, H., 1970. The influence of pyrophosphate, condensed phosphates, phosphonates and other phosphate compounds on the dissolution of hydroxyapatite in vitro and on bone resorption induced by parathyroid hormone in tissue culture and in thyroparathyroidectomised rats. Calcif. Tissue Res. 6, 183–196.

138. Russell, R.G.G., 2011. Bisphosphonates: The first 40 years. Bone 49, 2–19.

139. Russell, R.G.G., Watts, N.B., Ebetino, F.H., Rogers, M.J., 2008. Mechanisms of action of bisphosphonates: similarities and differences and their potential influence on clinical efficacy. Osteoporos. Int. 19, 733–759.

140. Saito, M., Mori, S., Mashiba, T., Komatsubara, S., Marumo, K., 2008. Collagen maturity, glycation induced-pentosidine, and mineralization are increased following 3-year treatment with incadronate in dogs. Osteoporos Int 19, 1343–1354.

141. Shen, J., Fan, L., Yang, J., Shen, A.G., Hu, J.M., 2010. A longitudinal Raman microspectroscopic study of osteoporosis induced by spinal cord injury. Osteoporos. Int. 21, 81–87.

142. Su, X., Sun, K., Cui, F.Z., Landis, W.J., 2003. Organization of apatite crystals in human woven bone. Bone 32, 150–162.

143. Takaishi, Y., Ikeo, T., Nakajima, M., Miki, T., Fujita, T., 2010. A pilot case-control study on the alveolar bone density measurement in risk assessment for bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. Osteoporos. Int. 21, 815–825.

144. Tarnowski, C.P., Ignelzi, Jr, M.A., Morris, M.D., 2002. Mineralization of developing mouse calvaria as revealed by Raman microspectroscopy. J Bone Min. Res 17, 1118–1126.

145. Uthgenannt, B.A., Kramer, M.H., Hwu, J.A., Wopenka, B., Silva, M.J., 2007. Skeletal self-repair: stress fracture healing by rapid formation and densification of woven bone. J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res. 22, 1548–1556.

146. Van Beek, E.R., Löwik, C.W., Ebetino, F.H., Papapoulos, S.E., 1998. Binding and antiresorptive properties of heterocycle-containing bisphosphonate analogs: structure-activity relationships. Bone 23, 437–442.

147. Viccica, G., Vignali, E., Marcocci, C., 2007. Role of the cholesterol biosynthetic pathway in osteoblastic differentiation. J. Endocrinol. Invest. 30, 8–12.

148. Vieillard, M.-H., Maes, J.-M., Penel, G., Facon, T., Magro, L., Bonneterre, J., Cortet, B., 2008. Thirteen cases of jaw osteonecrosis in patients on bisphosphonate therapy. Joint Bone Spine 75, 34–40.

149. Vigier, S., Catania, C., Baroukh, B., Saffar, J.-L., Giraud-Guille, M.-M., Colombier, M.-L., 2011. Dense fibrillar collagen matrices sustain osteoblast phenotype in vitro and promote bone formation in rat calvaria defect. Tissue Eng. Part A 17, 889–898.

150. Viguet-Carrin, S., Garnero, P., Delmas, P.D., 2006. The role of collagen in bone strength. Osteoporos. Int. 17, 319–336.

151. Von Knoch, F., Jaquiery, C., Kowalsky, M., Schaeren, S., Alabre, C., Martin, I., Rubash, H.E., Shanbhag, A.S., 2005. Effects of bisphosphonates on proliferation and osteoblast differentiation of human bone marrow stromal cells. Biomaterials 26, 6941–6949.

152. Waddington, R.J., Roberts, H.C., Sugars, R.V., Schönherr, E., 2003. Differential roles for small leucine-rich proteoglycans in bone formation. Eur. Cell. Mater. 6, 12–21.

153. Wang, Y., Azaïs, T., Robin, M., Vallée, A., Catania, C., Legriel, P., Pehau-Arnaudet, G., Babonneau, F., Giraud-Guille, M.-M., Nassif, N., 2012. The predominant role of collagen in the nucleation, growth, structure and orientation of bone apatite. Nat. Mater. 11, 724–733.

154. Weiner, S., Traub, W., Wagner, H.D., 1999. Lamellar bone: structure-function relations. J. Struct. Biol. 126, 241–255.

155. Weivoda, M.M., Hohl, R.J., 2011. Effects of farnesyl pyrophosphate accumulation on calvarial osteoblast differentiation. Endocrinology 152, 3113–3122.

156. Wen, D., Qing, L., Harrison, G., Golub, E., Akintoye, S.O., 2011. Anatomic site variability in rat skeletal uptake and desorption of fluorescently labeled bisphosphonate. Oral Dis 17, 427–432.

157. Wiesmann, H.P., Meyer, U., Plate, U., Höhling, H.J., 2004. Aspects of Collagen Mineralization in Hard Tissue Formation, in: International Review of Cytology. Academic Press, pp. 121–156.

158. Xiong, Y., Yang, H.J., Feng, J., Shi, Z.L., Wu, L.D., 2009. Effects of alendronate on the proliferation and osteogenic differentiation of MG-63 cells. J. Int. Med. Res. 37, 407–416.

159. Yamashita, J., Koi, K., Yang, D.-Y., McCauley, L.K., 2011. Effect of Zoledronate on Oral Wound Healing in Rats. Clin. Cancer Res. 17, 1405–1414.

160. Yang, B., Cui, F.Z., 2007. Molecular modeling and mechanics studies on the initial stage of the collagen-mineralization process. Curr. Appl. Phys. 7, Supplement 1, e2–e5.

161. Yerramshetty, J.S., Akkus, O., 2008. The associations between mineral crystallinity and the mechanical properties of human cortical bone. Bone 42, 476–482.

162. Yerramshetty, J.S., Lind, C., Akkus, O., 2006. The compositional and physicochemical homogeneity of male femoral cortex increases after the sixth decade. Bone 39, 1236–1243.

163. Zhang, L.-J., Feng, X.-S., Liu, H.-G., Qian, D.-J., Zhang, L., Yu, X.-L., Cui, F.-Z., 2004. Hydroxyapatite/collagen composite materials formation in simulated body fluid environment. Mater. Lett. 58, 719–722.

164. Zoehrer, R., Roschger, P., Paschalis, E.P., Hofstaetter, J.G., Durchschlag, E., Fratzl, P., Phipps, R., Klaushofer, K., 2006. Effects of 3- and 5-year treatment with risedronate on bone mineralization density distribution in triple biopsies of the iliac crest in postmenopausal women. J Bone Min. Res 21, 1106–1112.

ANNEXES

Annexe 1 : Variations des paramètres MEBE et Raman dans le modèle de néoformation chez le rat : moyennes ± SD des valeurs brutes selon le groupe et la zone observée (test *t* de Student). * *P* < 0.05 en comparaison avec le groupe CTL correspondant.

Paramètres	S120				M120				M600			
	Defect		Distance		Defect		Distance		Defect		Distance	
	CTL	ZA	CTL	ZA	CTL	ZA	CTL	ZA	CTL	ZA	CTL	ZA
Ca_{MOYEN}	26.42 ±1.01	**27.39* ±0.20**	24.06 ±0.79	24.19 ±0.24	26.02 ±1.28	26.15 ±1.40	24.01 ±1.05	24.45 ±1.25	28.04 ±1.17	27.92 ±1.35	24.77 ±0.09	24.33 ±1.03
Ca_{FWHM}	3.204 ±0.488	3.076 ±0.159	3.426 ±0.531	3.198 ±0.172	2.333 ±0.250	2.315 ±0.223	2.466 ±0.279	2.521 ±0.356	3.420 ±0.393	3.419 ±0.293	3.504 ±0.239	3.505 ±0.426
MaxFreq	4.748 ±0.371	4.923 ±0.119	4.624 ±0.360	4.853 ±0.271	7.357 ±0.452	7.241 ±0.789	6.802 ±0.452	6.775 ±0.506	6.937 ±0.553	6.555 ±0.478	5.896 ±0.444	5.513 ±0.374
Rapport minéral/organique	8.331 ±1.409	**9.258* ±0.892**	7.303 ±0.934	7.644 ±0.614	6.151 ±0.827	6.048 ±0.653	6.176 ±1.104	6.199 ±0.591	6.500 ±0.504	6.513 ±0.611	7.147 ±1.000	6.823 ±0.718
Cristallinité	0.0460 ±0.0006	0.0455 ±0.0008	0.0475 ±0.0008	0.0477 ±0.0008	0.0459 ±0.0008	0.0446 ±0.0014	0.0467 ±0.0018	0.0470 ±0.0009	0.0479 ±0.0012	0.0483 ±0.0008	0.0454 ±0.0016	0.0452 ±0.0016
Contenu en HPO_4	0.086 ±0.037	**0.063* ±0.009**	0.072 ±0.023	0.059 ±0.005	0.092 ±0.023	0.096 ±0.041	0.080 ±0.029	0.074 ±0.028	0.071 ±0.009	0.073 ±0.012	0.061 ±0.009	0.064 ±0.006
Substitution de type B en CO_3	0.094 ±0.004	0.094 ±0.004	0.095 ±0.003	0.098 ±0.002	0.103 ±0.004	0.099 ±0.003	0.103 ±0.005	0.103 ±0.004	0.100 ±0.009	0.102 ±0.006	0.105 ±0.006	0.105 ±0.004
Rapport hydroxyproline/proline	0.783 ±0.049	0.789 ±0.039	0.771 ±0.025	0.779 ±0.030	0.745 ±0.038	0.722 ±0.054	0.755 ±0.037	0.753 ±0.054	0.738 ±0.048	0.737 ±0.030	0.713 ±0.042	0.720 ±0.043

Annexe 2 : Etude préliminaire des variations des paramètres MEBE dans le modèle animal sur le groupe S120. Analyse d'images par zones d'intérêt larges ou réduites : moyennes ± SD des valeurs brutes (test U de Mann-Whitney) ; * *P* < 0.05 et ** *P* < 0.005 comparaison entre régions d'intérêt larges et réduites et † *P* < 0.05 comparaison entre les groupes CTL et ZA.

Paramètres	Régions d'intérêt larges				Régions d'intérêt restreintes			
	Défect		Distance		Défect		Distance	
	CTL (n = 7)	ZA (n = 7)	CTL (n = 7)	ZA (n = 7)	CTL (n = 7)	ZA (n = 7)	CTL (n = 7)	ZA (n = 7)
Ca_{MOYEN}	19.99 ±1.51	22.36 ±0.98	23.11 ±0.50	23.35 ±0.41	26.11** ±1.71	27.61**† ±0.70	24.24* ±0.70	24.22** ±0.43
Ca_{FWHM}	6.365 ±0.574	7.202† ±0.821	5.070 ±0.464	4.815 ±0.224	4.802* ±0.790	4.547** ±0.667	4.457 ±0.828	4.637 ±1.442
MaxFreq	1.846 ±0.523	1.576 ±0.166	2.659 ±0.246	2.771 ±0.134	3.187** ±0.430	3.540** ±0.248	3.467 ±0.235	3.586 ±0.236

Annexe 3 : Corrélation entre les différents paramètres MEBE et Raman dans le modèle de néoformation chez le rat : coefficient de régression R^2 et (niveau de significativité *P*) calculés à partir des valeurs relatives selon le groupe observé (régression linéaire simple).

			Ca_{MOYEN}	Ca_{FWHM}	MaxFreq	Rapport OHpro/proline	Contenu en HPO_4	Substitution en CO_3	Cristallinité
Rapport minéral/organique	S120	CTL	0.90 (0.406)	0.00 (0.976)	0.13 (0.305)	**0.62 (0.007)**	0.37 (0.064)	**0.45 (0.033)**	0.01 (0.801)
		ZA	0.14 (0.217)	0.33 (0.081)	0.00 (0.178)	0.06 (0.493)	0.04 (0.595)	0.00 (0.884)	0.13 (0.309)
	M120	CTL	0.01 (0.711)	0.01 (0.682)	0.03 (0.515)	0.70 (0.327)	0.30 (0.535)	0.63 (0.366)	0.08 (0.314)
		ZA	0.11 (0.217)	0.00 (0.952)	0.40 (0.051)	0.05 (0.443)	0.07 (0.331)	0.13 (0.187)	0.00 (0.866)
	M600	CTL	0.01 (0.740)	**0.41 (0.044)**	0.31 (0.092)	0.00 (0.941)	**0.27 (0.049)**	0.18 (0.110)	0.00 (0.971)
		ZA	0.37 (0.028)	0.03 (0.572)	0.08 (0.343)	0.04 (0.457)	**0.28 (0.041)**	0.05 (0.400)	0.01 (0.657)
Cristallinité	S120	CTL	0.04 (0.561)	0.12 (0.336)	0.01 (0.824)	0.03 (0.635)	0.21 (0.176)	0.27 (0.119)	
		ZA	0.00 (0.999)	0.13 (0.311)	0.05 (0.515)	0.28 (0.084)	0.00 (0.858)	0.33 (0.080)	
	M120	CTL	0.06 (0.368)	0.11 (0.235)	0.00 (0.914)	0.01 (0.884	0.11 (0.216)	0.02 (0.615)	
		ZA	0.27 (0.047)	0.05 (0.442)	**0.49 (0.003)**	**0.30 (0.033)**	0.01 (0.762)	0.01 (0.661)	
	M600	CTL	0.00 (0.902)	0.01 (0.805)	0.03 (0.628)	**0.85 (0.0001)**	0.14 (0.165)	0.01 (0.687)	
		ZA	0.00 (0.824)	0.06 (0.436)	0.04 (0.499)	**0.79 (0.0001)**	0.08 (0.291)	0.06 (0.372)	
Substitution de type B en CO_3	S120	CTL	0.02 (0.680)	0.23 (0.159)	0.02 (0.647)	0.27 (0.122)	0.27 (0.122)		
		ZA	0.01 (0.737)	0.04 (0.572)	0.03 (0.599)	0.09 (0.391)	0.01 (0.746)		
	M120	CTL	0.03 (0.516)	0.01 (0.679)	0.15 (0.153)	0.08 (0.288)	0.00 (0.881)		
		ZA	0.01 (0.069)	0.02 (0.575)	0.01 (0.669)	0.10 (0.253)	0.12 (0.212)		
	M600	CTL	0.04 (0.581)	0.01 (0.749)	0.00 (0.951)	0.02 (0.571)	0.00 (0.949)		
		ZA	0.10 (0.285)	0.00 (0.926)	0.05 (0.458)	0.05 (0.440)	0.24 (0.055)		
Contenu en HPO_4	S120	CTL	**0.59 (0.010)**	0.00 (0.950)	0.02 (0.688)	0.39 (0.054)			
		ZA	0.15 (0.268)	0.00 (0.838)	0.06 (0.480)	0.00 (0.880)			
	M120	CTL	0.18 (0.011)	0.03 (0.526)	0.15 (0.160)	0.17 (0.644)			
		ZA	0.01 (0.691)	0.05 (0.439)	0.00 (0.962)	0.00 (0.944)			
	M600	CTL	0.32 (0.083)	**0.47 (0.029)**	**0.68 (0.003)**	0.25 (0.058)			
		ZA	0.03 (0.561)	0.02 (0.627)	0.05 (0.458)	0.00 (0.824)			

PUBLICATIONS

Modifications de la composition et de la structure moléculaire du tissu osseux sous l'influence des bisphosphonates

Cécile OLEJNIK
131 p., 28 fig., 164 réf.

MOTS-CLES :
Biominéral, Bisphosphonate, Matrice organique, Microspectroscopie Raman, Minéralisation, Os, Qualité osseuse

---

RESUME :
Utilisés dans le traitement de nombreuses pathologies osseuses bénignes (ostéoporose) et malignes (myélome, métastases osseuses), les bisphosphonates ont une action inhibitrice sur la résorption et le remodelage osseux. Ils présentent une forte affinité pour l'os notamment pour les sites à fort remodelage. Ils permettent d'augmenter la masse et la densité de minéralisation osseuses. Les conséquences moléculaires de leur incorporation, en particulier dans les sites osseux à fort remodelage, restent encore à élucider. Ce travail se propose donc d'étudier à l'échelle moléculaire l'impact des bisphosphonates sur la composition et la structure du tissu osseux à partir de deux modèles de forte accumulation. Un modèle de néoformation osseuse chez le rat en site crânien et des échantillons issus de séquestres humains d'ostéonécrose des maxillaires liée aux bisphosphonates sont étudiés par microscopie électronique à balayage environnemental et microspectrométrie Raman. Nos résultats indiquent que, dans ces conditions, les bisphosphonates sont à l'origine de modifications du contenu minéral du tissu osseux et provoquent des altérations structurales concernant les phases minérale et organique. En particulier, une hyperminéralisation est mise en évidence dans le contexte physiopathologique spécifique de l'ostéonécrose des maxillaires liée aux bisphosphonates. Cette altération résulterait de processus de minéralisation secondaire avancés liés à l'inhibition du remodelage continu des maxillaires par les bisphosphonates. De plus, les modifications de la structure cristalline observées dans les deux modèles témoignent d'un effet direct des bisphosphonates lié aux interactions avec la maille cristalline. Enfin, une perturbation des phénomènes de stabilisation de la matrice collagénique au cours de la néoformation osseuse est suggérée et peut être attribuée à un effet des bisphosphonates sur les cellules ostéoblastiques. Ce travail a permis d'apporter des informations nouvelles sur l'impact des bisphosphonates sur la qualité osseuse à l'échelle moléculaire.

JURY :

Monsieur le Docteur Georges BOIVIN	Rapporteur
Monsieur le Professeur Philippe LESCLOUS	Rapporteur
Madame le Professeur Nathalie AZAROUAL	Examinatrice
Monsieur le Professeur Frédéric CUISINIER	Examinateur
Monsieur le Professeur Bernard CORTET	Examinateur
Monsieur le Professeur Guillaume PENEL	Directeur de thèse

ADRESSE DU LABORATOIRE :
PMOI EA4490, Faculté de Chirurgie Dentaire, place de Verdun, 59000 Lille