



Approches intégrées de la détermination de l'influence de fractions de collagène hydrolysé sur la santé osseuse.

Audrey Daneault

► To cite this version:

Audrey Daneault. Approches intégrées de la détermination de l'influence de fractions de collagène hydrolysé sur la santé osseuse.. Médecine humaine et pathologie. Université d'Auvergne - Clermont-Ferrand I, 2015. Français. NNT: 2015CLF1MM09 . tel-01545175

HAL Id: tel-01545175

<https://theses.hal.science/tel-01545175>

Submitted on 22 Jun 2017

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

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

UNIVERSITÉ BLAISE PASCAL

UNIVERSITÉ D'Auvergne

Année

N° d'ordre

*ECOLE DOCTORALE
DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE*

N° d'ordre :

Thèse

Présentée à l'Université d'Auvergne

pour l'obtention du grade de DOCTEUR
(Décret du 5 juillet 1984)

Spécialité : Nutrition

Soutenue le 7 septembre 2015

Audrey Daneault

Approches intégrées de la détermination de l'influence de
fractions de collagène hydrolysé sur la santé osseuse

Président:

Dr. **Stéphane Walrand**, Directeur de Recherche INRA – UMR1019 de Nutrition Humaine INRA/UDA
– Clermont-Ferrand – France

Rapporteurs :

Pr. **Olivier Bruyère**, Université de Liège - Service de Santé Publique, Épidémiologie et Économie de
la Santé – Liège – Belgique

Pr. **Gaël Rochefort**, Université Paris Descartes, Faculté d'odontologie – Montrouge - France

Membres :

Dr. **Janne Prawitt**, Société Rousselot – Gent – Belgium

Dr. **Véronique Coxam**, Directrice de Recherche INRA – UMR1019 de Nutrition Humaine INRA/UDA
– Clermont-Ferrand – France

Intitulé du Laboratoire d'accueil : UMR1019 INRA/UDA de Nutrition Humaine – Clermont-Ferrand
- France

Que ton aliment soit ta seule médecine

Hippocrate

La souris est un animal qui, tué en quantité suffisante et dans des conditions contrôlées, produit une thèse de doctorat.

Woody Allen

Remerciements

Ce mémoire est l'accomplissement de 3 années de recherche réalisées au sein de l'équipe Alimentation, Squelette et Métabolismes de l'Unité de Nutrition Humaine (UMR1019) de l'INRA de Clermont-Ferrand/Theix.

Je remercie l'ensemble des membres du jury de thèse : Dr. **Stéphane Walrand**, Pr. **Olivier Bruyère**, Pr. **Gaël Rochefort**, Dr. **Véronique Coxam** et Dr. **Janne Prawitt**.

Ces travaux ont été financés par Rousselot, je tiens à leur exprimer ma reconnaissance pour leur soutien financier. J'adresse toute ma gratitude à Madame **Véronique Fabien Soulé** pour m'avoir donné l'opportunité de faire cette thèse et pour son implication dans le suivi de mes travaux. J'associe à ces remerciements le docteur **Janne Prawitt** de la société **Rousselot**. Ses remarques, sa patience et sa gentillesse sont autant d'éléments qui m'ont permis d'atteindre les objectifs de cette thèse

C'est grâce au soutien scientifique de nombreuses personnes que j'ai pu mener cette thèse à son terme. Je tenais tout d'abord à remercier les personnes qui ont cru en moi et qui m'ont permis d'arriver au bout de cette thèse :

Je tiens à exprimer mes plus vifs remerciements à mon directeur de thèse, **Yohann Wittrant** pour m'avoir choisie sur ce projet, il y a quatre ans déjà. Je lui suis reconnaissante pour le temps qu'il m'a accordé malgré ses nombreuses tâches, sa franchise et sa sympathie. On a pu, ensemble, mener à bien ce projet. Très humblement, je voudrais te dire MERCI pour ton soutien pendant mes périodes de doutes et pour tes encouragements répétés.

J'adresse mes sincères remerciements à Madame **Véronique Coxam** pour m'avoir accueillie chaleureusement au sein de l'équipe, certes petite mais ô combien soudée. Merci pour ta gentillesse, ta disponibilité et ton aide précieuse.

Je remercie, par ailleurs, toutes les personnes de l'équipe pour le climat sympathique dans lequel ils m'ont permis de travailler :

- **Marie Jeanne Davicco** et **Patrice Lebecque**. Nos pauses café du matin et Milka de l'après-midi vont me manquer. Merci pour votre bonne humeur ! Je voudrais exprimer mes plus sincères remerciements à Marie Jeanne pour ses précieux conseils tant scientifiques que vestimentaires. Tu es notre Anna Wintour de la science. Les nombreuses discussions que j'ai pu avoir avec toi m'ont beaucoup apporté. Merci à Patrice pour ta contribution dans mon travail de thèse et tes petites brioches Francine.
- Merci à **Laurent Léotoing** pour tes précieux conseils, ton humour et tes Prince de Lu. Tu as su remplacer Yohann lorsqu'il n'était pas disponible.
- Je voudrais exprimer toute mon amitié à **Florian Di Iorio** pour sa gentillesse (je sais que tu adores ce mot). Merci de m'avoir fait découvrir les univers qui te passionnent tant (Moyen Age et Héroic Fantasy). Merci à **Claire**

pour nos discussions hautement scientifiques : mode et beauté. Merci à **Cédric Darie** et **Fabien Wauquier** pour leur sympathie et leur bonne humeur quotidienne. **Massimiliano**, j'espère que tu es content de ton passage en France ! Merci à **Gwenaëlle**, qui bien qu'étant passagère a su insuffler un vent de fraîcheur au sein de l'équipe. Bon courage pour la suite à tous les six!

J'adresse toute ma gratitude à toutes les personnes qui m'ont aidé de près ou de loin dans la réalisation de ce travail. Je pense notamment à toute les personnes travaillant à l'animalerie et à **l'équipe de Christophe Del'homme**. Merci à **Mehdi, Eli** et **Julien** de vous être si bien occupés de mes souris.

Je remercie toutes les personnes formidables que j'ai rencontrées par le biais de l'INRA. Merci pour votre support et vos encouragements :

- Mention spéciale à **Séverine** pour son amitié sincère et toutes nos discussions. Tu as su me remonter le moral. J'espère que malgré les kilomètres qui nous sépareront on restera toujours en contact.
- Je tiens à témoigner toute ma reconnaissance à **Sylvie** pour m'avoir enseigné les bases de la culture cellulaires, pour tes bonnes idées, ton soutien et ton écoute.
- Merci à toi **Camille**, mon ex-colloc' de bureau, pour m'avoir dit un jour : « Durant ta thèse, tu en apprends autant sur ton sujet que sur toi-même ». A quel point avais-tu raison ! Merci pour tes précieux conseils, ton aide et ton soutien surtout pendant la rédaction.
- Merci à **Aurélien Promeyrat, Anne Duconseille** et **Khaled Oueslati** pour les bons moments passés à la cantine avec vous. Mille mercis pour vos encouragements ! Bon courage à vous tous pour la suite !
- Merci à **Christian Ducrot, Laurent- Emmanuel Monfoulet, Laurence Artige** et **Corinne Lacquement** pour leur épaulement et leurs encouragements.

Enfin, les mots les plus simples étant les plus forts, j'adresse toute mon affection à mes **parents et ma famille**, en particulier ma maman **Danielle**. Loin des yeux mais pas loin du cœur ! Merci pour avoir fait de moi ce que je suis aujourd'hui. Je vous aime.

John, mes derniers remerciements te sont adressés. Merci à toi qui m'a soutenue et surtout supportée pendant ces 3 années. Merci d'avoir été là malgré la distance et pour la tonne de Kinder que tu as dû m'envoyer. Tu verras on l'aura notre jacuzzi !

J'oublie certainement d'autres personnes et je m'en excuse. Encore un grand merci à tous pour m'avoir conduit à ce jour mémorable. Ces 3 années m'ont permis de grandir et de m'épanouir. Je ne serais pas la même personne sans vous.

Pour finir, je dédie cette thèse à mes grands-parents **René** et **Josette** qui m'ont toujours répété : « Manges! Tu ne sais pas qui te mangeras ». J'espère que vous êtes fiers de moi !

Résumé

Les conséquences de l'évolution démographique vers une population de plus en plus âgée ont un impact énorme sur l'économie en termes de santé. Vieillir en bonne santé est devenu un enjeu majeur et il est devenu primordial d'instaurer des politiques de prévention. La nutrition apparaît comme l'une des stratégies préventives les plus prometteuses pour contrer la perte de masse osseuse liée à l'âge. Le couple Calcium/vitamine D ayant des effets limités, il est important de développer d'autres alternatives afin de préserver le capital osseux.

L'étude de l'effet du collagène hydrolysé (HC) sur le tissu osseux est devenue une thématique montante ces dernières années. Plusieurs études *in vivo* ont permis de démontrer que l'ingestion de collagène hydrolysé améliorait le développement de la masse osseuse. L'objectif de cette thèse a été d'étudier la pertinence de l'utilisation du HC dans la mise au point de stratégies nutritionnelles pour la prévention de l'ostéoporose.

Après avoir mis en évidence l'intérêt du HC sur l'activité d'ostéoblastes murins MC3T3-E1, nous avons évalué son effet *in vivo* sur des souris ovariectomisées : modèle d'ostéoporose post-ménopausique liée à une carence oestrogénique. Nous avons montré que le collagène hydrolysé d'origine bovine (BHC) contribue à limiter la perte osseuse induite par l'ovariectomie. Cette étude *in vivo* nous a permis de constater que la limitation de la perte osseuse induite est liée à un effet spécifique du BHC et dépendante de la longueur du peptide.

La deuxième partie de nos travaux a consisté à mettre en lumière le rôle des métabolites de collagène sur l'activité des cellules osseuses. Ainsi, le BHC favorise la survie et la différenciation ostéoblastique et inversement pour les ostéoclastes en modulant le ratio OPG / RANKL.

En résumé, nos résultats confirment le potentiel du collagène hydrolysé dans la prise en charge de la perte osseuse liée à l'âge et soulignent l'intérêt du collagène hydrolysé dans la conception de stratégies novatrices pour le management des troubles ostéoporotiques.

Abstract

Due to demographic changes healthy aging has become a major issue and interest in prevention has raised accordingly. In this context, nutrition has become one of the most promising strategies to counter age-related complications, including bone loss.

Effects of hydrolyzed collagen (HC) on the bone tissue have focused attention in recent years. Several *in vivo* studies have demonstrated that hydrolyzed collagen ingestion may preserve bone mass. The aim of this thesis was to study the relevance of HC use in the development of nutritional strategies for osteoporosis prevention.

The interest of HC was first investigated on the activity of murine osteoblasts MC3T3-E1. Then, we evaluated its effect on ovariectomized mice: a postmenopausal osteoporosis model related to estrogenic deficiency. We have shown that bovine hydrolyzed collagen (BHC) helps reducing bone loss induced by ovariectomy and that observed effect was specific and not related to protein content and that it was dependent on the mean molecular weight of the peptide.

The second part of our work emphasizes the role of collagen metabolites on bone cell activity. We demonstrated that enriched serum in BHC promotes osteoblast survival and differentiation, conversely inhibits osteoclastogenesis and modulates the OPG / RANKL ratio.

In summary, our results confirm the benefit of hydrolyzed collagen on bone and point out the value of hydrolyzed collagen in the design of innovative strategies for the management of osteoporotic disorders.

Préambule

Au même titre que l'obésité ou les maladies cardiovasculaires, l'ostéoporose constitue un problème de santé publique majeur en raison de la morbidité et de la mortalité qui lui sont associées. Elle se caractérise par une diminution de la masse osseuse ainsi qu'une altération de la microarchitecture du tissu osseux rendant la personne atteinte plus sujette aux fractures, particulièrement celles de la hanche, de la colonne vertébrale et du poignet. A titre d'exemple, on a recensé en 1990, 1,7 million de fractures de la hanche dans le monde et ce chiffre devrait atteindre 6,3 millions d'ici 2050 en raison du vieillissement de la population (Cooper, Campion, & Melton, 1992). Même si des stratégies thérapeutiques sont proposées, elles sont essentiellement curatives et présentent des effets secondaires. Ainsi, le développement d'alternatives préventives reste indispensable. Dans ce cadre, la nutrition apparaît comme une démarche prometteuse notamment pour assurer des apports optimaux en calcium et vitamine D. Outre ces nutriments classiques, certains facteurs extra-calciques ont aussi une action sur le métabolisme osseux comme les lipides, les polyphénols ou encore les protéines.

Le collagène de type I est la protéine constitutive majeure du tissu osseux. Il est utilisé dans la composition des biomatériaux pour la reconstruction des altérations osseuses (Chiara et al., 2012). D'autre part, ingéré sous forme hydrolysée, le collagène est reconnu pour diminuer la douleur de patients souffrant d'arthrose (Bagchi et al., 2002; Bruyere et al., 2012; Fujita, Ohue, Fujii, Miyauchi, & Takagi, 2002; Henrotin, Lambert, Couchourel, Ripoll, & Chiotelli, 2011; Moskowitz, 2000; Trc & Bohmova, 2011) et semble être une piste intéressante pour prévenir la perte de masse osseuse liée à l'âge. En effet, des travaux précédents ont mis en évidence certains effets bénéfiques du collagène hydrolysé (HC) dans un modèle de perte osseuse par carence hormonale (Cuneo, Costa-Paiva, Pinto-Neto, Morais, & Amaya-Farfan, 2010; De Almeida Jackix, Cuneo, Amaya-Farfan, de Assuncao, & Quintaes, 2010; Guillerminet et al., 2010; Guillerminet et al., 2012). L'intérêt du collagène hydrolysé a été confirmé à la fois chez la femme ménopausée en complément du traitement de l'ostéoporose (Moskowitz, 2000) et de façon intéressante, également chez l'adolescent (Martin-Bautista et al., 2011).

En 2010, dans le cadre d'une précédente thèse CIFRE entre Rousselot et AgroParisTech (UMR 914), Fanny Guillerminet a montré que le collagène hydrolysé pouvait augmenter l'activité des ostéoblastes, cellules en charge de la formation de l'os dans un modèle de culture primaire d'ostéoblastes/ostéoclastes (Guillerminet et al., 2010; Guillerminet et al., 2012). Ainsi la société Rousselot a également poursuivi des investigations sur différents processus de fabrication de collagène hydrolysé et l'intérêt d'une telle production dans le design de stratégies nutritionnelles visant à prévenir les complications osseuses liées à l'âge. Même si les peptides de collagène semblent avoir un effet bénéfique sur l'os pendant la croissance ou lors de carences hormonales leurs mécanismes d'action restent flous.

C'est dans ce contexte qu'une collaboration a été développée entre l'Equipe Alimentation Squelette et Métabolisme de l'Unité de Nutrition Humaine à l'INRA (UMR10191 INRA/UDA) de Theix et la société Rousselot (fabricant de gélatine et de collagènes hydrolysés). Elle a fait l'objet d'une bourse de thèse CIFRE subventionnée par l'Association

Nationale pour la Recherche Technique (ANRT). Ainsi, le projet COLLOS est basé sur l'hypothèse centrale que le collagène, outre sa composante structurale, possède un potentiel nutritionnel s'inscrivant dans la stratégie de prévention des altérations osseuses.

Table des matières

REMERCIEMENTS	1
RESUME/ABSTRACT	3
PREAMBULE	5
ELEMENTS DE CONTEXTE	9

Partie I: LE TISSU OSSEUX ET SON VIEILLISSEMENT

1. DEFINITION DE L'OSTEOPENIE ET DE L'OSTEOPOROSE	11
2. DONNEES EPIDEMIOLOGIQUES DE L'OSTEOPOROSE	12
3. DIAGNOSTIC DE L'OSTEOPOROSE	13
4. BASES CELLULAIRES ET MOLECULAIRES DE L'OSTEOPOROSE	15
1. TRAME ORGANO-MINERALE	15
2. CELLULES CONSTITUTIVES DU TISSU OSSEUX	16
1. Ostéoblastes	16
2. Ostéocytes	18
3. Ostéoclastes	19
3. CONTROLE DU REMODELAGE OSSEUX	21
1. Régulation locale : Communication ostéoblaste/ostéoclaste	23
2. Régulation systémique	24
1. Régulation de l'homéostasie phosphocalcique	25
2. Régulation par les œstrogènes	27
4. MASSE OSSEUSE AU COURS DE LA VIE	29
5. FACTEURS DE RISQUES	30
1. FACTEURS DE RISQUES ENDOGENES : LIES A LA DENSITE MINERALE OSSEUSE	30
2. FACTEURS DE RISQUES EXOGENES	31
6. TRAITEMENT DE L'OSTEOPOROSE ET PREVENTION DES FRACTURES	31
1. PHARMACOTHERAPIE	31
1. Traitements anti-résorptifs	32
2. Traitements anabolisants	34
2. PREVENTION DE L'OSTEOPOROSE	35
7. PREVENTION NUTRITIONNELLE DE L'OSTEOPOROSE	35
1. MICRONUTRIMENTS	35

1. Calcium	35
2. Vitamine D	36
3. Polyphénols	37
4. Vitamine C	37
2. MACRONUTRIMENTS	38
1. Lipides	38
2. Protéines	39
<i>Partie 2: LE COLLAGÈNE</i>	
1. COLLAGÈNE ENDOGÈNE : UN ÉLÉMENT CONSTITUTIF DE L'OS	41
1. UNITÉ DE BASE STRUCTURELLE DU COLLAGÈNE DE TYPE I	42
2. SYNTHÈSE DU COLLAGÈNE	43
3. DÉGRADATION DU COLLAGÈNE	46
4. RELATION COLLAGÈNE DE TYPE I ET CELLULES OSSEUSE	48
5. RÔLE DU COLLAGÈNE DANS L'OS	49
2. LE COLLAGÈNE EXOGENE ALIMENTAIRE	51
OBJECTIFS DE LA THÈSE	53
RESULTATS	57
<i>Article 1: BIOLOGICAL EFFECT OF HYDROLYZED COLLAGEN ON BONE METABOLISM</i>	59
<i>Article 2: BOVINE HYDROLYZED COLLAGEN PROMOTES BONE HEALTH IN OVARECTOMIZED MICE THROUGH MODULATION OF OSTEOBLAST AND OSTEOBLAST COUPLING</i>	61
DISCUSSION ET CONCLUSION	63
BIBLIOGRAPHIE	73
ANNEXES	89
ABREVIATIONS	91
LISTE DES ILLUSTRATIONS	93
LISTE DES COMMUNICATIONS	95



ELEMENTS DE CONTEXTE

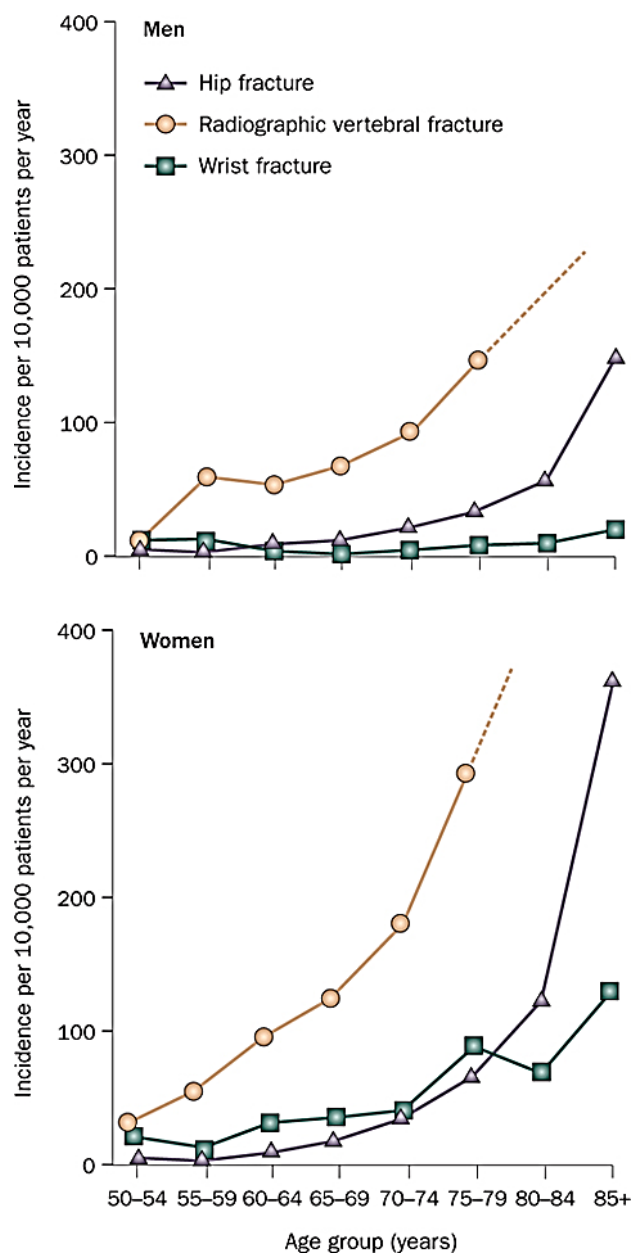


Figure 1: Incidence de fractures vertebrales, femorales et du poignet selon l'âge et le sexe. D'après P. Sambrook and Cooper (2006)

En France, la durée de vie moyenne en 2013 était de 78,7 ans pour les hommes et de 84,5 ans pour les femmes (INSEE, 2014). On estime qu'en 2050, un tiers des personnes résidant en France sera âgée de 60 ans ou plus (Robert-Bobée, 2007). Si les séniors vivent de plus en plus vieux, l'augmentation de l'espérance de vie s'accompagne désormais d'une augmentation de l'apparition de maladies dégénératives pouvant toucher différents tissus dont l'os. Une perte graduelle de la masse osseuse entraîne une ostéopénie voire une ostéoporose avec l'âge. Ceci altère la qualité de vie avec une perte d'autonomie. On assiste alors à une dichotomie entre espérance de vie et espérance de vie en bonne santé, impactant à la fois les systèmes de santé et la qualité de vie des patients.

LE TISSU OSSEUX ET SON VIEILLISSEMENT

I. DEFINITION DE L'OSTEOPENIE ET DE L'OSTEOPOROSE

Depuis 1993, l'ostéoporose est définie comme une affection diffuse du squelette, caractérisée par une masse osseuse faible et des altérations de la microarchitecture du tissu osseux augmentant la propension de fractures (Conférence, 1993). L'ostéopénie, quant à elle, est une condition pour laquelle la densité minérale osseuse est plus faible que la normale. Elle est considérée comme le précurseur de l'ostéoporose. Les termes de densité osseuse « faible » ou « diminuée » peuvent être utilisés pour décrire l'ostéopénie (Karaguzel & Holick, 2010).

Le risque ostéoporotique augmente avec l'âge et est deux fois plus élevé chez les femmes que chez les hommes en raison des changements hormonaux survenant à la ménopause (J. A. Kanis, 1994; Lespessailles et al., 2009) (Figure 1). Environ 40% des femmes et 13% d'hommes de type caucasien de plus de 50 ans souffriront dans leur vie d'une fracture liée à l'ostéoporose (Kamel & O Connell, 2006; Leem, Lee, Jang, & Kim, 2013).

D'un point de vue conceptuel, les professionnels de santé distinguent différents types d'ostéoporoses:

L'ostéoporose primaire désigne à la fois la perte osseuse hormonale chez les femmes ménopausées (type I) et la perte osseuse en raison du processus normal de vieillissement (type II).

- L'ostéoporose de type I dite « post-ménopausique », résulte d'un arrêt de la fonction ovarienne chez la femme après la ménopause. Il s'agit de la forme la plus fréquente. On estime que 40% des femmes ménopausées avec une densité minérale osseuse normale à l'âge de 50 ans souffriront d'une fracture de fragilité dans leur vie (Scheiber & Torregrosa, 1998).
- L'ostéoporose de type II (sénile) est liée à l'âge avec une perte à la fois de l'os cortical et trabéculaire conduisant finalement à des fractures de la hanche (Boonen et al., 1995). Elle affecte deux fois plus de femmes que d'hommes (Kamel, 2006).

L'ostéoporose dite secondaire peut, quant à elle, être induite par certaines pathologies (affections endocriniennes) ou certains traitements (glucocorticoïdes) interférant avec l'accrétion osseuse et/ou susceptibles de prédisposer à une perte osseuse accélérée (Boling, 2004; H. Shen, Recker, & Deng, 2003). Elle peut aussi résulter d'une fragilité osseuse excessive (ostéogénèse imparfaite). A titre d'exemple, l'ostéoporose secondaire survient chez 30% à 50% des patients recevant une corticothérapie de longue durée (Boling, 2004).

2. DONNEES EPIDEMIOLOGIQUES DE L'OSTEOPOROSE

L'ostéoporose est considérée comme une menace médicale socio-économique et le nombre de personnes atteintes ne cesse de croître. Actuellement, on estime que 200 millions de personnes en souffrent à travers le monde (Lane, 2006). Au sein de l'Union Européenne, en 2010, 22 millions de femmes et 5,5 millions d'hommes souffrent d'ostéoporose, dont 43000 personnes sont mortes à la suite de fractures ostéoporotiques (Figure 2). Rien qu'en France, le nombre d'individus estimé souffrant d'ostéoporose s'élève à environ 3,5 millions de personnes (Svedbom et al., 2013).

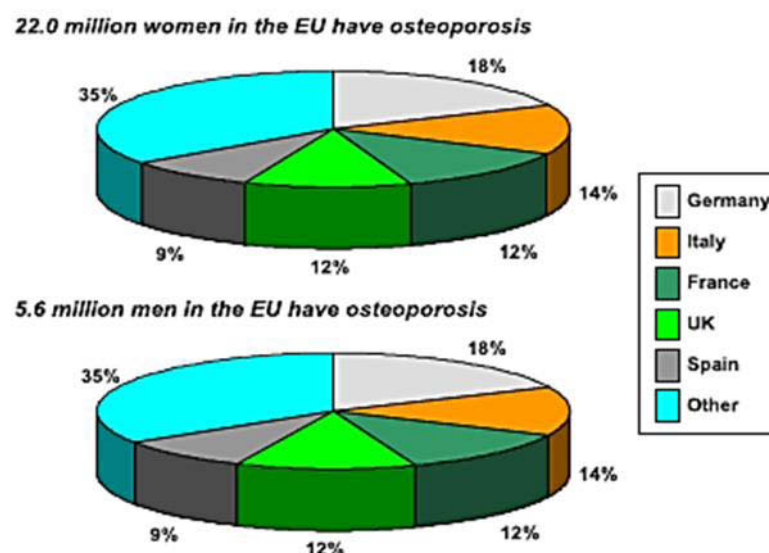


Figure 2 : Distribution de la prévalence de l'ostéoporose au sein de l'Union Européenne. D'après Hernlund et al. (2013)

Le risque de mortalité est doublé chez les personnes qui ont subi une fracture de hanche par rapport aux témoins appariés du même âge (Morin et al., 2011). Mais cette prévalence est probablement sous-estimée car l'ostéoporose est souvent sous diagnostiquée (Curran, Maravic, Kiefer, Tochon, & Fardellone, 2010; Lespessailles et al., 2009).

Toujours au sein de l'UE, le coût annuel de fractures de fragilité est estimé à 37 milliards d'euros. Et d'ici 2025, celui-ci devrait augmenter de 25% (Hernlund et al., 2013).

Parmi les fractures ostéoporotiques les plus courantes, on retrouve celles de la hanche, les fractures vertébrales, et celles de l'avant-bras (Hernlund et al., 2013). En France, toujours en 2010, environ 377000 nouvelles fractures de fragilité se sont produites dont 74 000 fractures de la hanche, 56 000 fractures vertébrales, 56 000 fractures de l'avant-bras et 191000 sur d'autres sites (à savoir des fractures du bassin, des côtes, de l'humérus, du tibia, du péroné, de la clavicule, de l'omoplate, du sternum et d'autres fractures fémorales) (Svedbom et al., 2013).

Il existe de très grandes variations dans l'incidence de fractures ostéoporotiques entre les différentes populations étudiées. Le niveau de vie moyen semble être un facteur majeur mais ce n'est pas le seul.

3. DIAGNOSTIC DE L'OSTÉOPOROSE

La perte osseuse est initialement asymptomatique et l'ostéoporose n'est souvent diagnostiquée qu'après une première fracture. En 1994, un comité d'experts de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a défini des critères diagnostiques de l'ostéoporose basés sur la mesure de la Densité Minérale Osseuse (DMO) (ostéodensitométrie) (H. Shen et al., 2003).

La DMO est définie comme la quantité de masse osseuse par unité de volume (g/cm³), ou par unité de surface (densité surfacique g/cm²). L'ostéodensitométrie (souvent appelée DXA ou DEXA pour Dual Energy X-rays Absorptiometry) constitue actuellement l'approche diagnostique la plus fréquente de l'ostéoporose. L'ostéodensitométrie est utilisée à la fois pour le diagnostic de l'ostéoporose, la mesure du risque de fracture chez un patient et le suivi de la réponse à un traitement contre l'ostéoporose. La DXA génère des rayons X de deux énergies différentes. L'atténuation différentielle de ces deux énergies permet de calculer la teneur minérale osseuse (hydroxyapatite) et la composition des tissus mous dans la région scannée par la DXA (Glen M. Blake & Fogelman, 2010). La DXA mesure la densité surfacique de l'os (Glen M Blake & Fogelman, 1997). En réalité, la DXA ne mesure que la quantité d'os, elle ne mesure ni sa qualité ni sa résistance directement (Laskey, 1996).

Ainsi, les personnes dont la DMO est inférieure à plus de 2,5 déviations standard ($T\text{-score} \leq -2,5$) au-dessous de la valeur moyenne observée chez les jeunes adultes sont considérées comme ostéoporotiques (Lespessailles et al., 2009) (Figure 3). Un individu sera alors considéré comme ostéopénique quand sa DMO se situera entre 1,0 et 2,5 déviations standard ($-1 > T\text{-score} > -2,5$) (Karaguzel & Holick, 2010). Le $T\text{-score}$ correspond à la différence entre la DMO mesurée d'un patient et la DMO moyenne de jeunes adultes en bonne santé, de même sexe et de même groupe ethnique, par rapport à l'écart-type d'une population jeune et adulte (Glen M. Blake & Fogelman, 2010).

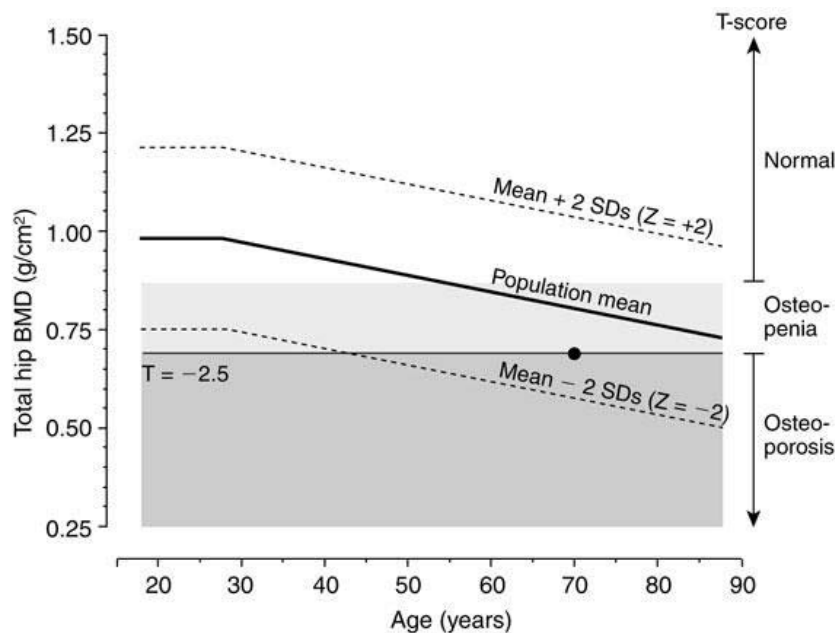


Figure 3 : Détermination de la DMO et du T-score lors d'une ostéodensitométrie. L'OMS a proposé un système de classification épidémiologique pour lequel l'ostéoporose est diagnostiquée à partir d'un T-score inférieur à -2,5. D'après P. N. Sambrook, Seeman, Phillips, and Ebeling (2002)

L'évaluation du risque de fracture (FRAX) peut être utilisé comme une modalité d'évaluation pour la prédiction des fractures sur la base de facteurs de risque cliniques, avec ou sans l'utilisation de la densité minérale osseuse du col du fémur (Unnanuntana, Gladnick, Donnelly, & Lane, 2010). La mesure des taux de marqueurs sériques et/ou urinaires donne une indication sur le risque futur de la perte osseuse et des fractures. Plus important encore, ils sont utiles dans le suivi de l'efficacité du traitement inhibiteur de la résorption osseuse dans les populations de patients atteints d'ostéoporose (Wheater, Elshahaly, Tuck, Datta, & van Laar, 2013). De plus, ils sont cliniquement utiles pour déterminer les causes possibles d'ostéoporose secondaire en identifiant les patients avec un remodelage osseux important et une perte osseuse rapide (Naylor & Eastell, 2012). Par ailleurs, les marqueurs de remodelage osseux peuvent être utilisés lors d'essais cliniques dans la compréhension du mécanisme d'action des agents thérapeutiques. Néanmoins, l'International Osteoporosis Foundation et l'International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine Bone Marker Standards Working Group considèrent que des normes de référence internationales pour l'évaluation des marqueurs de formation et de résorption osseuse devraient être établies (Vasikaran et al., 2011).

Parmi ces marqueurs on distingue, les marqueurs sériques de formation osseuse qui sont l'ostéocalcine totale, l'isoenzyme osseuse de la phosphatase alcaline (bALP) et le C- et N-propeptide du collagène de type I (PICP et PINP respectivement). Les marqueurs de la résorption osseuse sont : l'isoforme 5b de la phosphatase acide tartrate résistante (TRAP 5b) qui reflète l'activité ostéoclastique, les fragments de dégradation du collagène de la matrice osseuse, y compris les réticulations du collagène de type I (pyridinoline PYD et la désoxypyridinoline DPD) et les télépeptides du collagène de

type I (NTX et CTX) qui peuvent être mesurés dans l'urine ou le sérum (Biver et al., 2012). Le rôle de ces fragments de collagène sera détaillé dans le deuxième chapitre consacré au collagène.

4. BASES CELLULAIRES ET MOLECULAIRES DE L'OSTEOPOROSE

Le tissu osseux est un tissu conjonctif complexe constitué d'une matrice extracellulaire minéralisée lui conférant sa rigidité et sa solidité et de différentes cellules osseuses lui permettant son renouvellement et l'adaptation à son environnement. Il est le réservoir en calcium et en phosphate de l'organisme.

1. Trame organo-minérale

La matrice osseuse est constituée d'une partie minérale (de 50 à 70%), d'une partie organique (20 à 40%), d'eau (5 à 10%) et de lipides (<3%) (Clarke, 2008).

La phase organique est composée à 90% par du collagène (discuté dans la deuxième partie de l'étude bibliographique). Les 10% restants sont constitués de protéines non collagéniques (NCPs). Celles-ci jouent un rôle dans la qualité de l'os. Les principales NCPs sont : l'ostéocalcine, qui est la plus abondante, l'ostéopontine et la sialoprotéine osseuse. Elles impactent la formation des fibrilles de collagène et coordonnent les interactions cellules-matrice extracellulaire.

Le processus physiologique de minéralisation (ou calcification) se produit tout au long de la vie, à la fois durant la croissance et la vie adulte (Sapir-Koren & Livshits, 2011). La Figure 4 illustre schématiquement le processus de minéralisation.

Trois étapes sont nécessaires à la minéralisation de la matrice osseuse :

- Elle commence par l'initiation de la formation de cristaux d'hydroxyapatite $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$ à l'intérieur de vésicules matricielles. Ce sont des vésicules extracellulaires formées par bourgeonnement de la membrane des ostéoblastes ou de chondroblastes hypertrophiques. (E. E. Golub, 2009). Elles sont dotées de systèmes de transports permettant d'accumuler le phosphate inorganique et le calcium à l'intérieur.
- Lors de la seconde étape de minéralisation, ces cristaux sont allongés dans l'espace extracellulaire. Cet allongement nécessite des concentrations appropriées de calcium Ca^{2+} et de phosphate inorganique (Pi) à l'extérieur des vésicules matricielles (Orimo, 2010). Le Pi est produit par hydrolyse du pyrophosphate inorganique (PPi). Ce PPi, inhibant la formation d'hydroxyapatite, est hydrolysé par une enzyme, la phosphatase alcaline (ALP). La phosphatase alcaline est localisée à l'extérieur de la membrane plasmique des ostéoblastes et de la membrane de vésicules matricielles. Elle agit à la fois pour augmenter la concentration locale de Pi, et pour diminuer la concentration de pyrophosphate extracellulaire, un inhibiteur de la formation minérale (Ellis E Golub & Boesze-Battaglia, 2007) (Figure 4).

- Enfin, les cristaux d'hydroxyapatite ainsi formés seront ultérieurement associés aux fibrilles de collagène de la matrice organique (J. P. Bonjour, 2011).

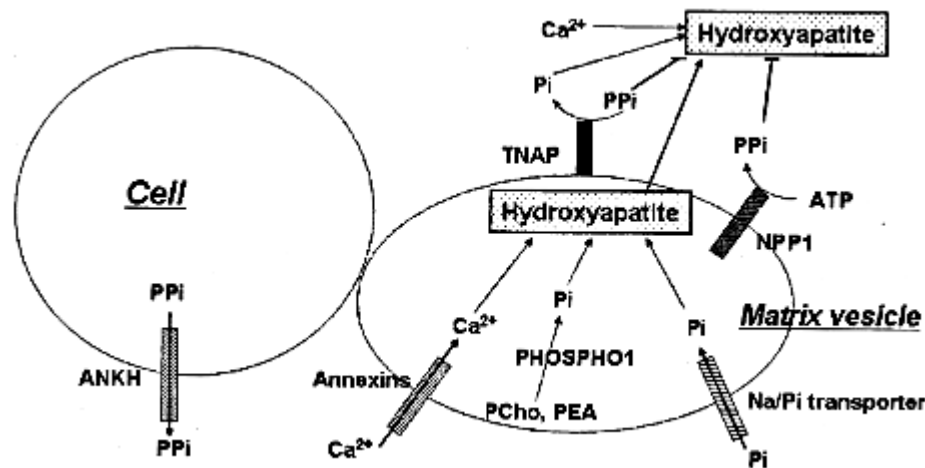


Figure 4: Illustration schématique du processus de minéralisation. La minéralisation commence avec la formation d'hydroxyapatite à l'intérieur de vésicules bourgeonnant d'ostéoblastes ou de chondrocytes hypertrophiques. Le cristal pénètre la membrane de la vésicule pour sortir et être allongé grâce à l'action de l'ALP qui hydrolyse le PPI en Pi. Les cristaux ainsi formés se déposent entre les fibrilles de collagène. D'après Orimo (2010)

Certains modèles proposent que les NCPs agissent comme une sorte de colle à l'interface de la matrice collagène-minéral permettant aux fibrilles minéralisées de résister à leur séparation et d'améliorer par conséquent la résistance mécanique (Morgan, Poundarik, & Vashishth, 2015; Nikel, Laurencin, McCallum, Gundberg, & Vashishth, 2013).

2. Cellules constitutives du tissu osseux

1. Ostéoblastes

La matrice osseuse organique est synthétisée par les ostéoblastes (OB). Les OB dérivent de cellules mésenchymateuses pluripotentes et partagent un linéage commun avec les chondroblastes, myoblastes, fibroblastes ou encore adipocytes (Figure 5).

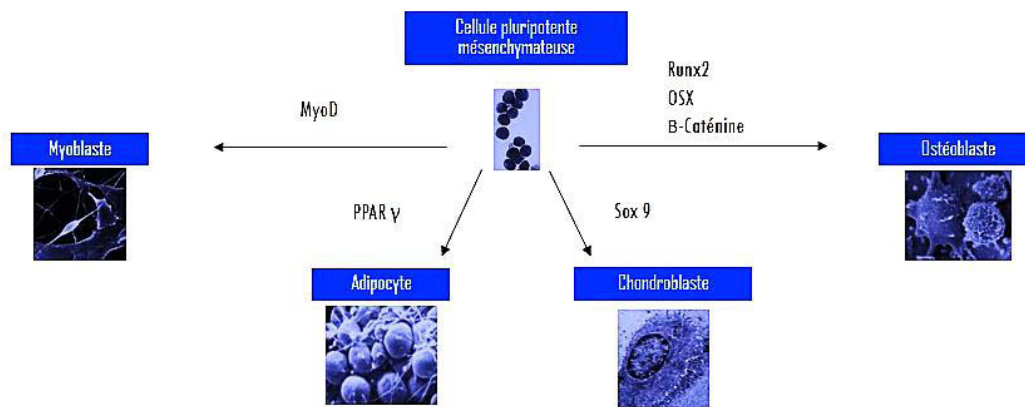


Figure 5 : Devenir des cellules souches mésenchymateuses. Le devenir des cellules mésenchymateuses est contrôlé par les facteurs de transcription qui orientent les cellules vers la lignée ostéoblastique, chondrogénique, adipocytaire ou myoblastique. Runx2, Ostérix (OSX) et la β Caténine sont les facteurs de transcription intervenant lors de la différenciation ostéoblastique.

Leur différenciation est un processus très précoce et dépendant de la présence des facteurs de transcription : Runx2 (appelé aussi Chfa-1), Ostérix et β -Caténine (Komori, 2006; Marie, 2008) (Figure 5). La différenciation s'accompagne de l'apparition de marqueurs phénotypiques caractéristiques des ostéoblastes (collagène de type I, phosphatase alcaline, ostéocalcine et sialoprotéine osseuse (Figure 6).

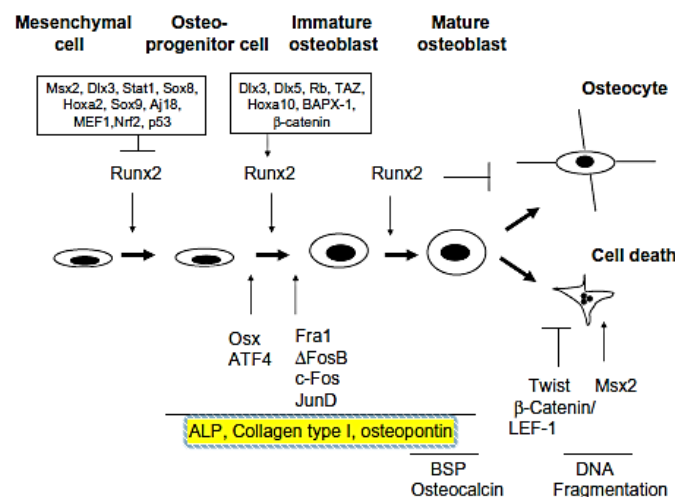


Figure 6 : Contrôle de la différenciation ostéoblastique et apparition de marqueurs ostéoblastiques. Runx2 interagit avec plusieurs protéines régulatrices de la matrice osseuse, activant ou réprimant les gènes qui contrôlent la prolifération ou la différenciation ostéoblastique. D'après Marie (2008)

Les ostéoblastes sont responsables de l'élaboration de la matrice organique et de la synthèse de protéines impliquées dans les processus de minéralisation. A noter que la différenciation ostéoblastique requiert la participation des facteurs selon un mode autocrine, paracrine ou endocrine, incluant les Protéines Morphogénétiques Osseuses (BMP), l'Insuline Growth Factor 1 (IGF1) et le TGF β (Chen, Deng, & Li, 2012; James, 2013). A la fin de leur différenciation, ils peuvent devenir des ostéocytes et s'emmurer dans la matrice osseuse, être transformés en cellules bordantes, ou bien mourir par apoptose (Clarke, 2008). Enfin, ils contrôlent aussi le renouvellement de l'os en modulant l'activité des ostéoclastes (Matsuo & Irie, 2008).

2. Ostéocytes

Les ostéocytes sont les cellules les plus abondantes et la matrice osseuse. Ils communiquent à la fois entre eux et avec les cellules qui tapissent la surface de l'os par l'intermédiaire d'un vaste lacis canaliculaire (Figure 7).

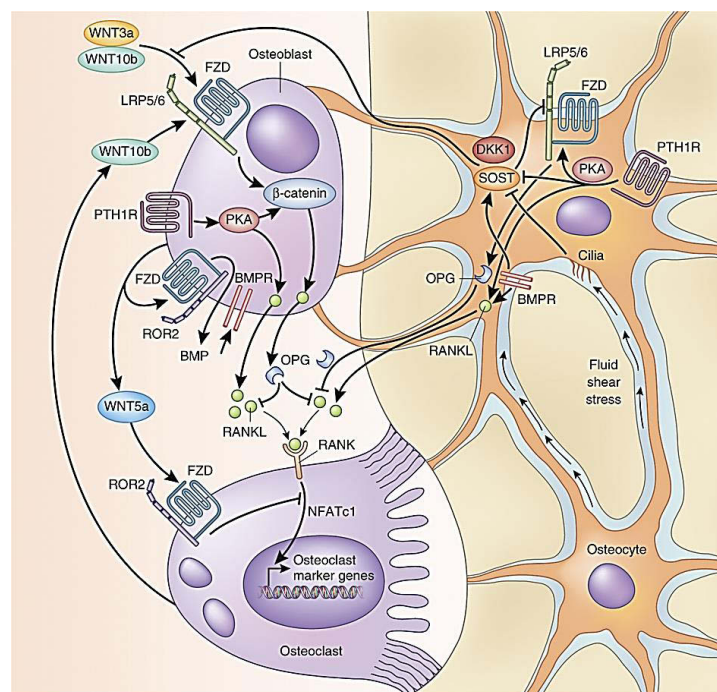


Figure 7 : Illustration d'ostéocytes emmurés dans la matrice osseuse.
D'après R. Baron and Kneissel (2013)

Ce sont des cellules différenciées de la lignée ostéoblastique, elles sont non prolifératives. Elles résident à la fois dans la matrice osseuse minéralisée et l'ostéoïde nouvellement formé. Ces cellules sont situées à l'intérieur de petites lacunes dans l'os et forment un immense réseau de connexions via de petits processus cytoplasmiques ou dendritiques dans des canalicules (Noble, 2008).

3. Ostéoclastes

A l'opposé des ostéoblastes, les ostéoclastes (OC) résorbent le tissu osseux en détruisant la matrice extracellulaire calcique. D'origine hématopoïétique, ce sont des cellules plurinucléées obtenues par fusion de précurseurs dérivant de progéniteurs médullaires communs avec la lignée des monocytes/macrophages (Figure 8).

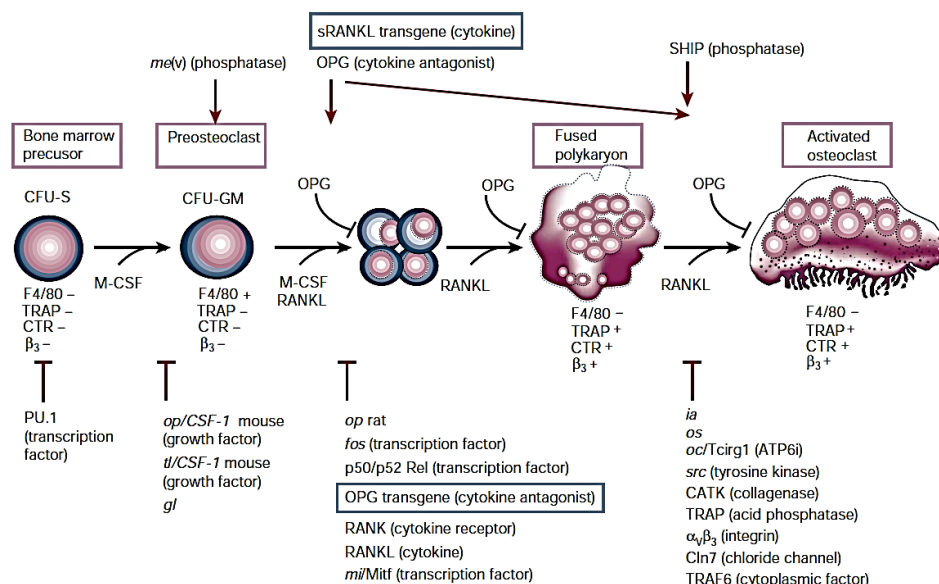


Figure 8 : Différenciation des ostéoclastes. D'après Boyle, Simonet, and Lacey (2003)

Leur formation, leur activation et leur resorption sont régulées par le ratio du ligand au Récepteur Activateur de NF κ B (RANKL)/ Ostéoprotégérine (OPG), les interleukines 1 et 6 (IL-1 et IL-6), le Colony Stimulating Factor-1 (CSF-1), l'hormone parathyroïdienne, la 1,25dihydroxyvitamine D, et la calcitonine (Clarke, 2008). Les facteurs CSF-1 et RANKL sont nécessaires pour induire l'expression de gènes spécifiques de la lignée ostéoclastique dont ceux codant pour la phosphatase acide tartrate résistante (TRAP) et la Cathepsine K (CatK), le récepteur à la calcitonine et l'intégrine β_3 , associés la maturation ostéoclastique (Boyle et al., 2003).

Les ostéoclastes sont des cellules polarisées. Ils se lient aux peptides de la matrice osseuse via leurs récepteurs. La famille β_1 des intégrines situées sur les ostéoclastes se lient au collagène, à la fibronectine et à la laminine et l'intégrine majeure $\alpha_v\beta_3$ se lie à l'ostéopontine et à la sialoprotéine osseuse (Clarke, 2008). Lorsque les ostéoclastes entrent en contact avec la matrice osseuse minéralisée, ils subissent des changements de structure interne (réarrangements du cytosquelette d'actine afin de former une jonction étanche entre la surface de l'os et la membrane basale) afin de s'attacher à la matrice osseuse pour créer un compartiment étanche appelé « chambre de résorption » (Boyle et al., 2003) (Figure 9). Les intégrines assurent la médiation de la fixation des podosomes des ostéoclastes à la matrice extracellulaire (Crockett, Rogers, Coxon, Hocking, & Helfrich, 2011).

La résorption osseuse se déroule en 3 étapes :

- Tout d'abord, la chambre de résorption est acidifiée par une augmentation de la concentration en ions H^+ . Cette diminution du pH a pour conséquence de dissoudre la partie minérale de la matrice osseuse.
- L'ostéoïde exposé est ensuite digéré par des enzymes protéolytiques (Everts & Saftig, 2011). En effet, les OC relarguent des enzymes de dégradation matricielles dont TRAP et CatK dans la chambre de résorption (Figure 9).
- Le processus de résorption osseuse crée ainsi, une forte concentration de fragments de collagène dégradés, en calcium et en phosphate à l'intérieur de la lacune de résorption (lacune de Howship). Ces produits de dégradation sont transportés activement à travers les ostéoclastes par transcytose à l'intérieur de vésicules et relâchés au niveau de la membrane apicale (Coxon & Taylor, 2008). Ceux-ci atteignent en fin de compte la circulation sanguine, et les fragments de collagène sont excrétés dans l'urine (Vaananen, Zhao, Mulari, & Halleen, 2000).

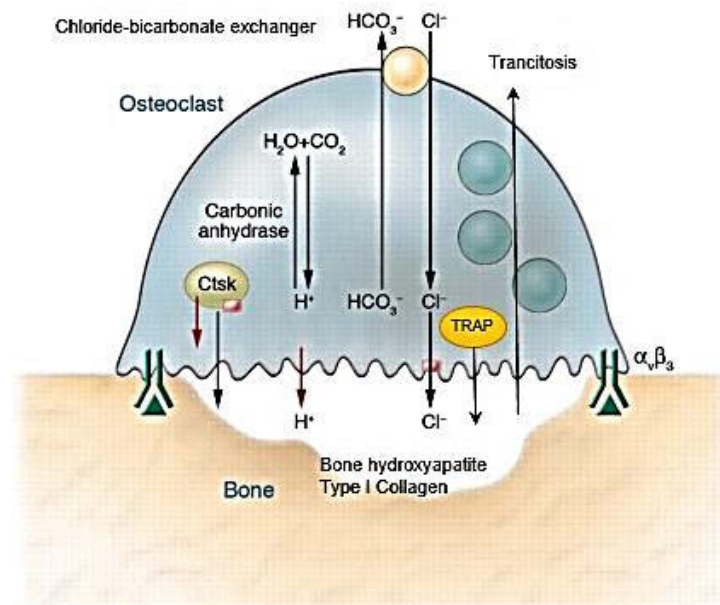


Figure 9 : Mécanisme de la résorption ostéoclastique. L'ostéoclast adhère à l'os via l'intégrine $\alpha_v\beta_3$. L'anhydrase carbonique génère des ions H^+ et HCO_3^- à partir du CO_2 et de H_2O . Les protons et les ions chlorures sont transportés ainsi à travers la membrane en bordure en brosse de l'ostéoclaste dans la lacune de résorption par une pompe à proton $H^+ATPase$ et un canal chlorure. L'environnement acide facilite la dissolution du minéral osseux pour dégrader la matrice minérale. Ensuite, la matrice organique est dégradée par la CatK et l'enzyme TRAP. Ces produits de dégradation sont transcytosés au niveau de la membrane apicale de l'ostéoclaste. D'après: http://www.biology-online.org/articles/skin_bone/figures.html

3. Contrôle du remodelage osseux

Le tissu osseux est le siège d'un remaniement perpétuel qui nécessite un couplage étroit entre formation et résorption. C'est un processus hautement coordonné nécessaire pour réparer les dommages et maintenir l'homéostasie phosphocalcique (Raggatt & Partridge, 2010).

Le remodelage osseux correspond à un processus cyclique d'érosion et de comblement le long de la structure osseuse. Le remodelage osseux se produit dans de nombreux sites de manière asynchrone dans tout le squelette (Sims & Martin, 2014). Il s'effectue dans des zones précises de l'os nommées Unités de Remodelage Osseux (ou BMU pour Basic Multicellular Unit). Les BMU sont constituées des cellules des deux lignées, les ostéoclastes et les ostéoblastes. Dans chaque BMU, les actions de résorption et de formation sont équilibrées : la quantité d'os formé compense la quantité d'os précédemment résorbé par les ostéoclastes.

Récemment, la « canopée » ou compartiment de renouvellement osseux (Bone Remodeling Compartment) a été décrite comme une structure recouvrant l'unité de remodelage osseux et la séparant de la moelle osseuse au niveau de l'os trabéculaire (Sims & Martin, 2014; Wesseling-Perry, 2014). En effet, la BMU localisée à la surface de l'os est recouverte par la canopée constituée principalement de cellules d'origines mésenchymateuses. La Figure 10 illustre ce phénomène : une fine couche de cellules allongées formant un espace confiné séparant l'os trabéculaire de la moelle osseuse.

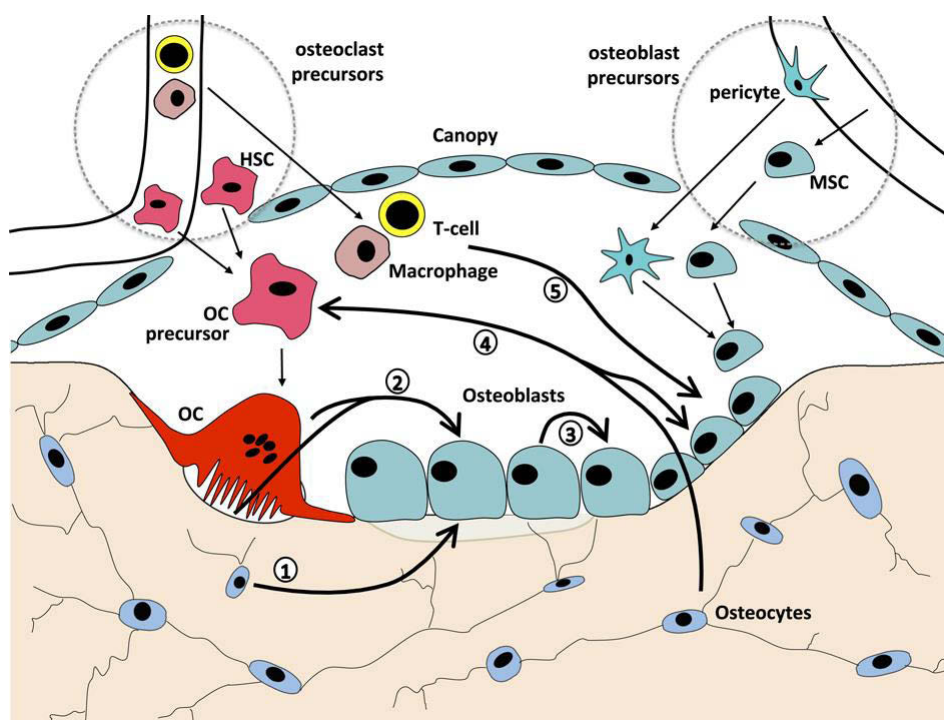


Figure 10 : Remodelage osseux au sein d'une Unité de Remodelage.
D'après Sims and Martin (2014)

Le cycle de remodelage osseux a été décrit comme un cycle comportant des phases d'activation des ostéoclastes, de résorption, de réversion et enfin de formation (Matsuo & Irie, 2008). Il est présenté en Figure 11.

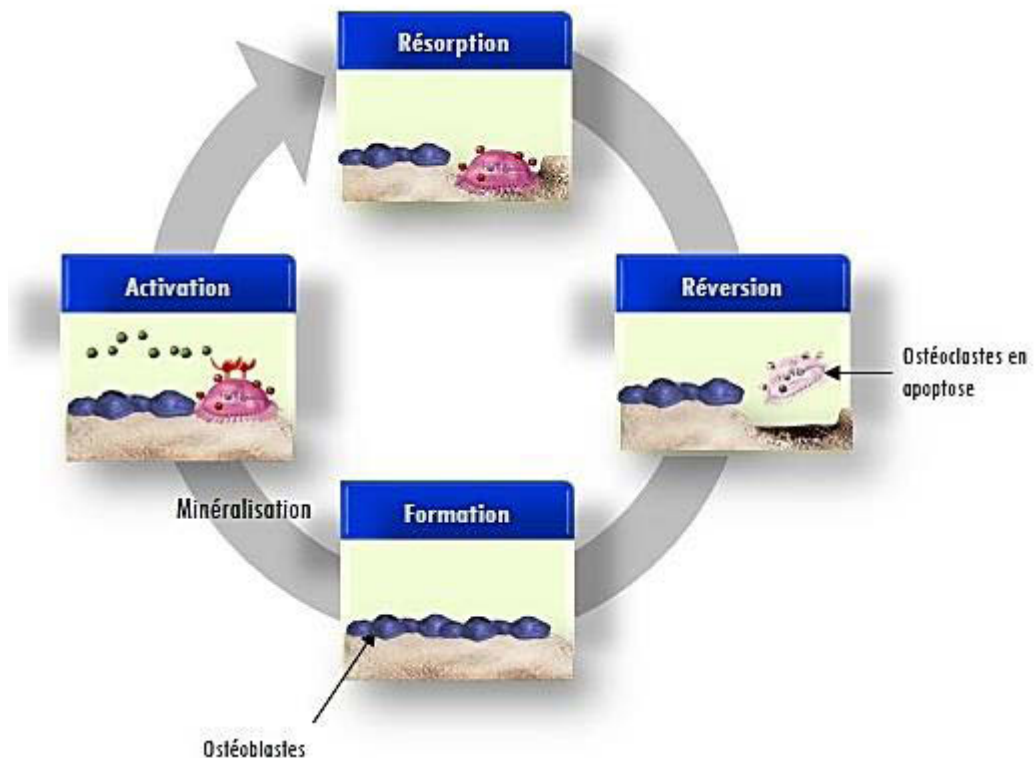


Figure 11 : Cycle de remodelage osseux.

Phase d'activation: Pendant un cycle de remodelage, les pré-ostéoclastes sont activés, puis migrent, et fusionnent pour former des OC matures sur les sites où la matrice osseuse doit être remplacée en raison d'une diminution de la qualité de la matrice, de la viabilité cellulaire, ou de microfractures (Henriksen, Neutsky-Wulff, Bonewald, & Karsdal, 2009).

Phase de résorption: Les ostéoclastes résorbent la matrice osseuse. Cette phase dure environ 1 à 2 semaines chez l'Homme.

Phase de réversion: A la fin de la phase de résorption, un arrêt apparent du cycle est observé pendant quelques jours avant que les ostéoblastes migrent à leur tour vers la cavité de resorption pour synthétiser les principaux constituants de la matrice osseuse (collagène de type I, NCPs...) (Clarke, 2008).

On sait aujourd'hui qu'il existe une communication bidirectionnelle entre les 2 types cellulaires. L'expression de l'Ephrine B2 située sur les ostéoclastes entraîne l'activation de la formation osseuse par les ostéoblastes par l'intermédiaire de leur liaison à l'Ephrine B4, tandis que l'expression de l'Ephrine B4 sur les ostéoblastes, à son tour inhibe l'ostéoclastogénèse via l'Ephrine B2 (Henriksen et al., 2009; Matsuo & Irie, 2008) (Figure 12).

Phase de formation: Lors de la phase de formation (environ 2-3 mois), les OB synthétisent la matrice osseuse, qui sera ensuite minéralisée (Figure 11). A la fin de cette phase, les OB ont plusieurs devenir : soit ils retournent dans un état de quiescence, soit ils meurent par apoptose, soit ils s'incluent dans la matrice pour devenir des ostéocytes (Roland Baron & Hesse, 2012).

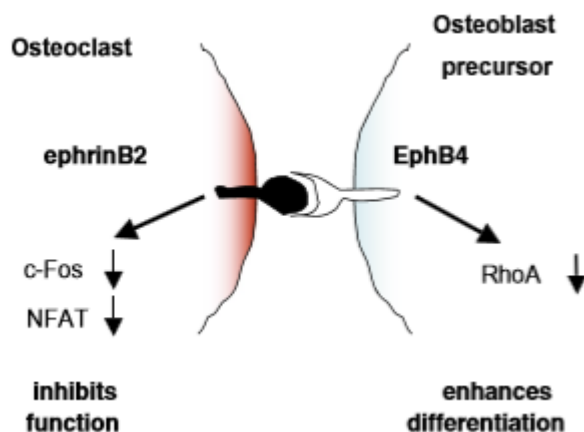


Figure 12 : Représentation schématique du signal bidirectionnel émis par l'éphrine B2 (ostéoclaste) et l'éphrine B4 (précurseur des ostéoblastes). Le signal émis par l'éphrine B2 supprime la fonction ostéoclastique alors que le signal émis par l'éphrine B4 augmente la différenciation ostéoblastique. D'après Matsuo and Irie (2008)

Lorsque le remodelage osseux est altéré, les activités ostéoblastiques et les ostéoclastiques sont découplées et le processus de remodelage est altéré. C'est notamment le cas lors de l'établissement de l'ostéoporose (Theoleyre et al., 2004). Le taux du remodelage osseux double à la ménopause, triple treize ans plus tard et reste élevé lorsque l'ostéoporose est établie (Recker, Lappe, Davies, & Heaney, 2004).

Lors du remodelage osseux, les séquences successives de résorption et d'apposition osseuses sont finement régulées par des facteurs systémiques et locaux.

1. Régulation locale : Communication ostéoblaste/ostéoclaste

Parmi ces facteurs, la triade cytokinique (OPG/RANK/RANKL) se comporte tel un pivot moléculaire pour la communication ostéoclastes/ostéoblastes et la coordination de leurs activités. RANKL est une protéine transmembranaire synthétisée à la surface des ostéoblastes, des lymphocytes B et des cellules stromales (Kawai et al., 2006) puis libérée par protéolyse, qui se fixe à son récepteur RANK à la surface des précurseurs ostéoclastiques pour en activer la différenciation et induire leur activité de résorption. A l'inverse, OPG également synthétisée et sécrétée par les ostéoblastes, agit comme un « récepteur leurre » en bloquant la liaison de RANKL à son récepteur RANK et ainsi protéger l'os en empêchant la maturation et l'activité des ostéoclastes (Boyle et al., 2003) (Figure 13). OPG est produite en réponse

à des agents anabolisants tels que les œstrogènes et les Protéines Morphogéniques Osseuses (BMP). L'expression des cytokines RANKL et d'OPG est donc coordonnée pour réguler la résorption osseuse positivement ou négativement par le contrôle de l'état d'activation de RANK et donc de maturation des ostéoclastes (Boyle et al., 2003). Les cytokines produites localement (IL-1, IL-6 et IL-11 et TNFα) stimulent la synthèse de RANKL.

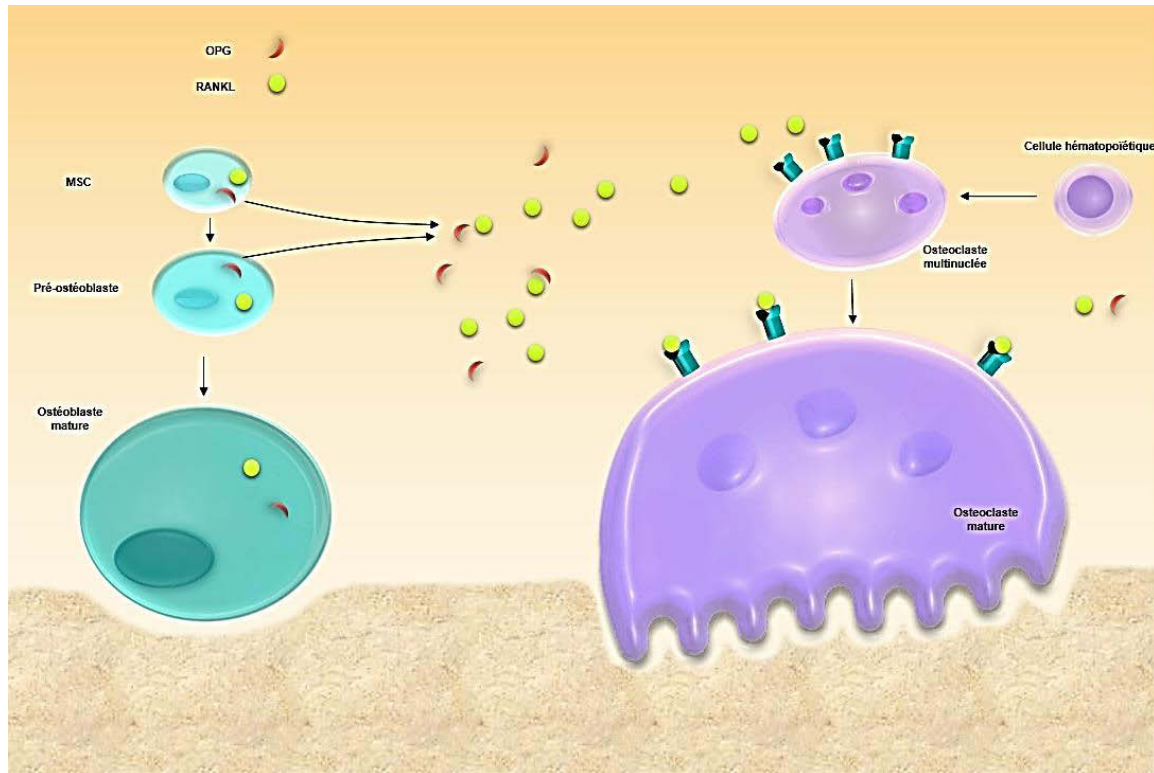


Figure 13 : Régulation de la communication ostéoblastes/ostéoclastes à travers la triade cytokinique. Abréviations: OPG, osteoprotegerin; RANK, Receptor Activator of nuclear factor κB ; RANKL, receptor activator of nuclear factor κB ligand; MSC, cellules souches mésenchymateuses.

2. Régulation systémique

Les os constituent le réservoir principal de calcium. Au besoin, le calcium est libéré dans la circulation sanguine sous forme de Ca^{2+} . Cette régulation est régulée par l'action de 3 hormones principales : la 1,25-dihydroxy-vitamine D, l'hormone parathyroïdienne (PTH) et la calcitonine, qui régulent les flux calciques au niveau intestinal, osseux et rénal (Figure 14). Le calcium est absorbé dans l'intestin, excrété ou réabsorbé par les reins, stocké au niveau du tissu osseux et libérés en cas de besoin de l'organisme via le processus de résorption.

1. Régulation de l'homéostasie phosphocalcique

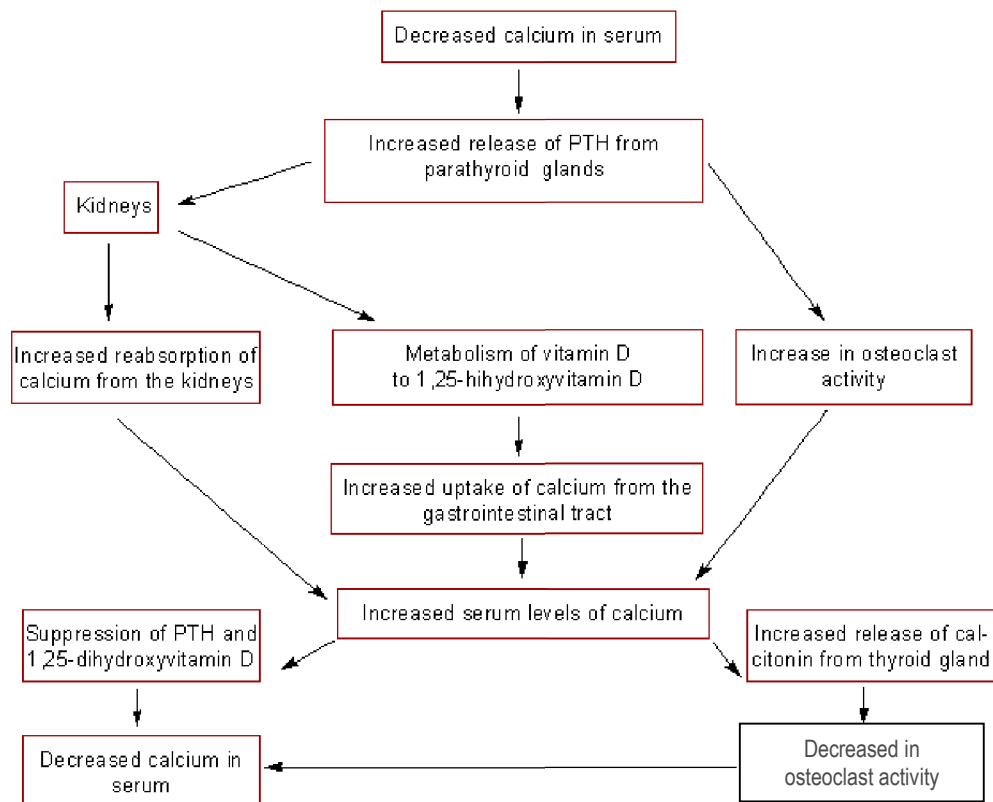


Figure 14 : Régulation schématisée de l'homéostasie phosphocalcique par la vitamine D, l'hormone parathyroïdienne et la calcitonine.

La vitamine D

La 1,25-dihydroxyvitamine D3 ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$) est le principal métabolite biologiquement actif de la famille des stérols de la vitamine D. La $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ peut être obtenue de différentes façons. À partir de précurseurs présents dans l'alimentation (Cholécalciférol VD3 ou ergocalciférol VD2) ou à partir de la transformation du 7-déhydrocholestérol en cholécalciférol au niveau de la peau lors d'une exposition au soleil (St-Arnaud, 2008). La VD3 et la VD2 subissent ensuite une première hydroxylation au niveau du foie (25OH-VD_3 ou calcidiol) puis une seconde au niveau du rein pour obtenir soit de la $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ou de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (Lips, 2006). Cette dernière exerce alors son action au niveau de tissus-cibles en se liant à son récepteur, le VDR (Vitamin D Receptor) (Carmeliet, Dermauw, & Bouillon, 2015; S. Christakos, Ajibade, Dhawan, Fechner, & Mady, 2010). Le terme générique de vitamine D sera utilisé par la suite pour faciliter la compréhension.

La vitamine D est considérée comme le principal facteur de régulation du transport de calcium intestinal et rénal. En effet, afin de maintenir des taux de calcium sériques normaux, le calcium est absorbé dans l'intestin et réabsorbé dans le rein en fonction des besoins de l'organisme. Lorsque que les taux plasmatiques de calcium sont faibles, la vitamine D

se lie à son récepteur afin d'augmenter l'absorption de calcium (Sylvia Christakos et al., 2013 284) (Figure 15). Et si les flux de calcium intestinaux et rénaux seront insuffisants pour rééquilibrer efficacement le niveau de calcium sérique, le calcium sera libéré de l'os (Carmeliet et al., 2015).

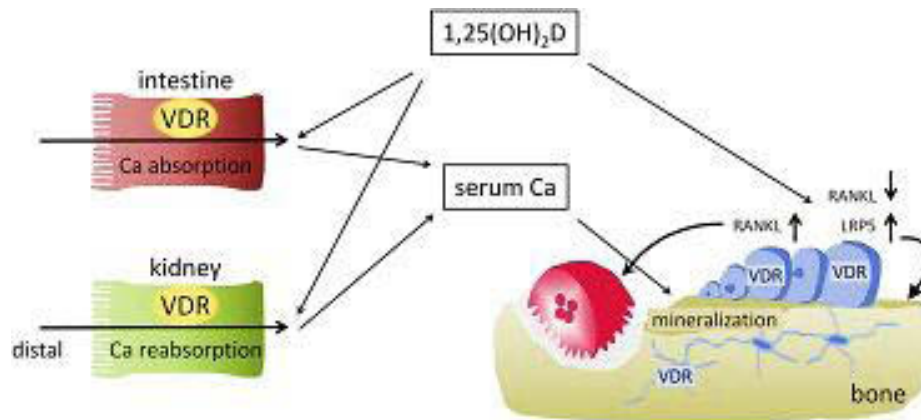


Figure 15 : Modèle de l'équilibre du calcium: La vitamine D favorise l'absorption intestinale du calcium. Lorsque les taux plasmatiques de calcium sont faibles, la vitamine D se lie à son récepteur situé au niveau de l'intestin et sur les tubules distaux du rein afin de ré-augmenter les taux plasmatiques. D'après Carmeliet et al. (2015)

De plus, lorsque que les niveaux plasmatiques de calcium sont faibles, les niveaux sériques de vitamine D augmentent et agissent directement sur les cellules ostéoformatrices (ostéoblastes/ostéocytes) qui produisent du RANKL afin d'accroître la résorption osseuse et donc de libérer du calcium (Lieben & Carmeliet, 2013). Par ailleurs, Kuroki, Shiozawa, Kano, and Chihara (1995) ont démontré que la vitamine D inhibait la synthèse de collagène ainsi que son expression dans des ostéoblastes MC3T3-E1. In vitro, la vitamine D affecte la prolifération des ostéoblastes, ainsi que leur différenciation et leur minéralisation, mais ces effets varient avec le temps de traitement, le dosage et l'origine des ostéoblastes (van Driel & van Leeuwen, 2014).

Paradoxalement, la forme active de la vitamine D est utilisée comme agent thérapeutique pour la prévention de l'ostéoporose. Elle augmente la densité minérale osseuse en diminuant la résorption osseuse. Les effets de la vitamine D in vitro et in vivo semblent opposés. A l'heure actuelle on ne connaît pas encore le mécanisme expliquant cette différence mais (Takahashi, Udagawa, & Suda, 2014) ont tenté de l'expliquer.

La parathormone ou hormone parathyroïdienne

La parathormone (PTH) est une protéine de 84 acides aminés synthétisée et sécrétée par les cellules principales de la glande parathyroïde. La PTH sécrétée est rapidement dégradée au niveau du foie, avant d'être éliminée par les reins. Sa sécrétion est dépendante de la concentration en calcium extracellulaire (Langdahl, Mortensen, Vesterby, Eriksen, & Charles, 1996). Elle induit le relargage du calcium et du phosphore de l'os. Elle stimule la réabsorption du calcium et

l'inhibition de la réabsorption du phosphate des tubules rénaux. Elle entraîne la stimulation de la production rénale de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ce qui augmente l'absorption intestinale de calcium et de phosphate (Figure 16).

Du côté cellulaire, la PTH stimule la sécrétion ostéoblastique de RANKL, stimulant ainsi la prolifération et la différenciation ostéoclastique. Enfin, elle inhibe l'expression d'OPG (Huang et al., 2004).

Quand le taux de calcium sanguin est atteint, la sécrétion de PTH est inhibée et il y a libération de calcitonine par la thyroïde. (Mundy & Guise, 1999).

La calcitonine

La calcitonine est un peptide de 32 acides aminés qui est synthétisée et sécrétée par les cellules parafolliculaires de la glande thyroïde. Celle-ci inhibe la réabsorption osseuse et favorise l'activité des ostéoblastes, qui se mettent à élaborer du tissu osseux. La calcitonine inhibe directement la résorption osseuse des ostéoclastes (Mundy & Guise, 1999). Le calcium se dépose dans la matrice osseuse ainsi formée et de ce fait le taux sanguin de calcium chute. Parallèlement on observe une diminution de l'absorption intestinale et rénale de calcium (Figure 16).

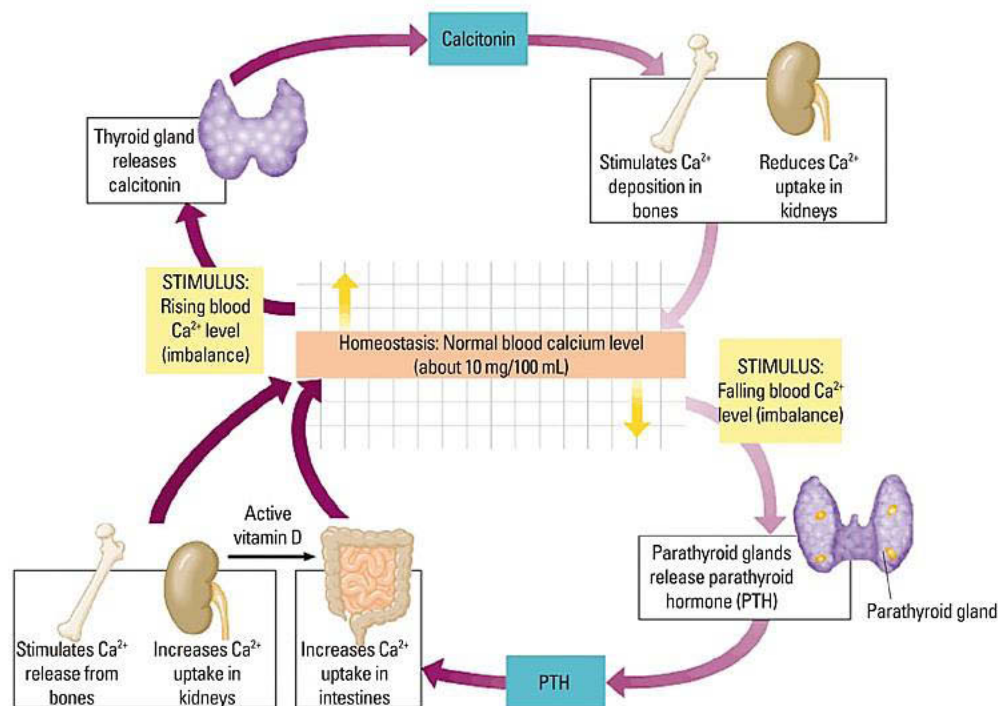


Figure 16 : Régulation de l'homéostasie calcique par l'hormone parathyroïdienne et la calcitonine. D'après Yi, Choi, and Lee (2011)

2. Régulation par les œstrogènes

La ménopause est caractérisée par une période initiale de perte osseuse rapide (5 à 10%) suivie d'une perte plus lente (Hillard & Stevenson, 1991; Kalu, 1991). La première phase se produit durant les dix premières années suivant

l'arrêt des règles ou après une ovariectomie thérapeutique. Cette perte de masse osseuse est due à la baisse du niveau d'œstrogènes endogènes chez la femme. De façon similaire, l'ovariectomie chez les rongeurs conduit à un phénotype ostéoporotique (Kalu, 1991).

Les œstrogènes régulent l'activité des ostéoblastes, des ostéoclastes et de leur communication via la régulation de la production de facteurs paracrines par les ostéoblastes (Monroe, Secreto, & Spelsberg, 2003). En fait, les œstrogènes peuvent moduler directement l'activité des cellules osseuses, sur lesquelles se trouvent des récepteurs spécifiques ER α and ER β (ER pour Estrogen Receptor) (Zallone, 2006). Les effets des œstrogènes sont médiés majoritairement par le récepteur ER α (Imai et al., 2009).

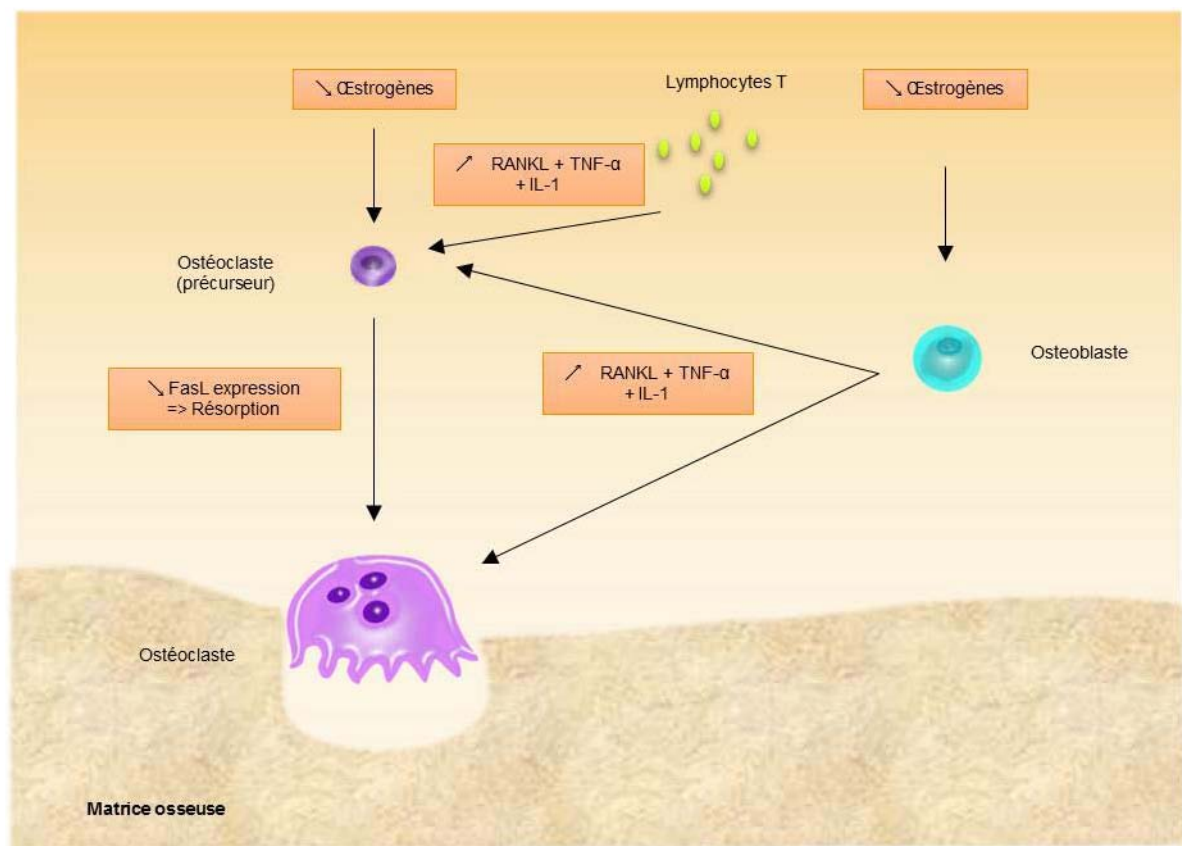


Figure 17 : Modèle d'action des œstrogènes sur les cellules osseuses lors de la ménopause basé sur l'hypothèse de Nakamura et al. (2007)

Effet direct

Les œstrogènes stimulent l'apoptose des ostéoclastes en se liant à leurs récepteurs et arrêtent l'apoptose des ostéoblastes et des ostéocytes (Karaguzel & Holick, 2010). On constate alors lors d'une carence oestrogénique suite à une ovariectomie une augmentation de la résorption osseuse provoquée par l'augmentation du nombre et de l'activité des ostéoclastes notamment par le biais d'une augmentation de la production de RANKL (Karaguzel & Holick, 2010) (Figure 17).

Nakamura et al. (2007) ont proposé un modèle d'action direct des œstrogènes sur les ostéoclastes. Les œstrogènes agissent via leur récepteur ER α , entraînant une régulation du ligand de Fas (*FasL*) par les ostéoclastes et/ou leurs précurseurs. *FasL* est une protéine appartenant à la famille des TNF (Tumor Necrosis Factor). Les ostéoclastes exprimant le récepteur Fas, une augmentation du taux de FasL entraîne alors leur apoptose, limitant le nombre et la durée de vie des ostéoclastes. En l'absence d'œstrogènes, l'expression de FasL est perdue et la durée de vie des OC est prolongée. Les OC en contrepartie stimulent les OB pour booster la formation osseuse, néanmoins l'effet résorptif reste dominant et on assiste à une perte osseuse (Novack, 2007) (Figure 17). Contrairement à Nakamura qui a proposé un mécanisme autocrine impliquant uniquement les ostéoclastes, Krum et ses collègues (2008) ont décrit un modèle d'action paracrine dans lequel les œstrogènes agissent sur la survie des ostéoclastes à travers la régulation de FasL par les ostéoblastes (et non les ostéoclastes).

Effet indirect

Par ailleurs, les œstrogènes peuvent aussi moduler indirectement l'activité des cellules osseuses. Le déficit oestrogénique est associé à une augmentation des cytokines qui favorisent la différenciation des ostéoclastes (Zallone, 2006). La chute du niveau d'œstrogènes entraîne une production de cytokines ostéoclastogéniques et inflammatoires, dont le TNF α et l'Interleukine (IL)-1, libérée par les cellules de la lignée ostéoblastique et les lymphocytes T (Novack, 2007).

4. Masse osseuse au cours de la vie

La masse osseuse augmente rapidement pendant la croissance, et l'accrétion se poursuit pendant quelques années jusqu'à atteindre un pic entre l'âge de 20 et 30 ans représenté sur la Figure 18. Ce pic de masse osseuse, pouvant être défini comme la quantité de tissu osseux présent à la fin de la maturation squelettique, est un déterminant important du risque de fracture ostéoporotique. Les sujets ayant une masse osseuse «maximale» faible seront plus exposés à l'ostéoporose que les autres.

Le capital osseux reste stable puis diminue lentement avec l'âge à raison de 0,5 à 1% par an chez l'homme. Chez la femme, cette décroissance s'accroît avec l'entrée en ménopause et se poursuit au rythme de 1 à 2% par an. En moyenne, une femme ménopausée perd environ 2% de sa BMD par an (Fardellone et al., 2010). Ce taux de perte osseuse semble être plus grand durant les premières années après la ménopause. La perte osseuse se poursuit dans les années suivantes, mais le taux de déminéralisation semble diminuer (Tanriover et al., 2010).

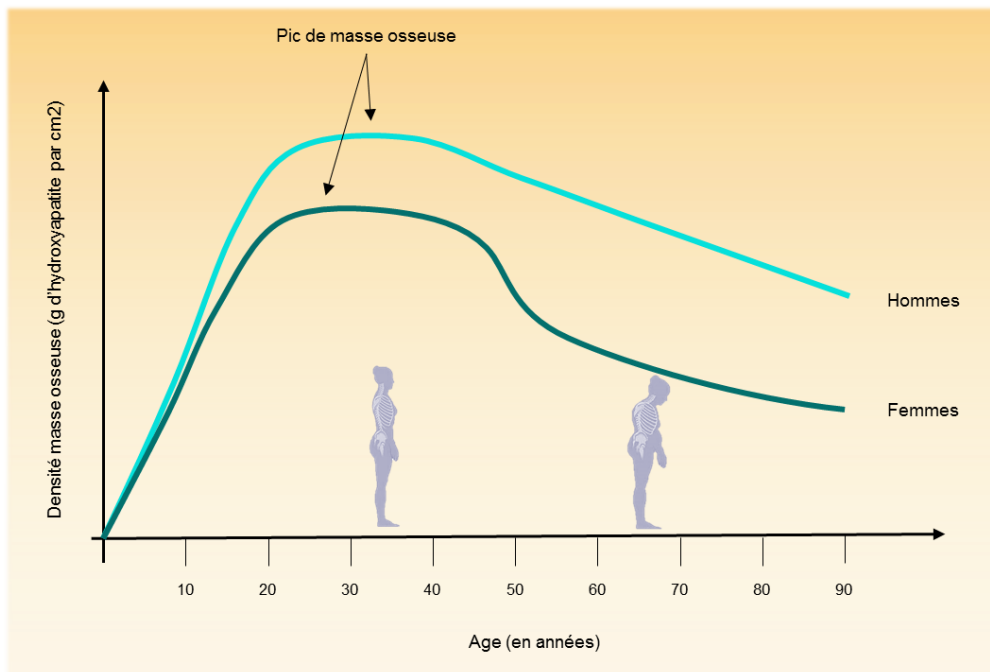


Figure 18 : Pic de masse osseuse. Avant la puberté, aucune différence entre les sexes n'a été rapportée (J-Ph Bonjour, Theintz, Law, Slosman, & Rizzoli, 1994). L'âge exact auquel le pic de masse osseuse est atteint varie avec la région du squelette et avec la façon dont la masse osseuse est mesurée (Heaney et al., 2000).

5. FACTEURS DE RISQUES

L'ostéoporose est une maladie multifactorielle. Il existe plusieurs catégories de facteurs de risques.

1. Les facteurs de risques endogènes : liés à la densité minérale osseuse

L'ostéoporose est une maladie progressive du squelette caractérisée par une masse osseuse faible et une détérioration de la microarchitecture. Ceci souligne qu'une masse osseuse faible est un important facteur de risque de fracture. Environ $\frac{3}{4}$ de la variance du pic de masse osseuse d'une population est déterminé par des facteurs génétiques (Heaney et al., 2000). Un pic de masse osseuse bas sera alors associé à une DMO faible et à une diminution « plus rapide » de la masse osseuse au cours du vieillissement augmentant le risque de fractures. Une étude portant sur des jumeaux a montré que jusqu'à 85% de la variation de la DMO peut être attribuée à la génétique (Das & Crockett, 2013).

L'âge, l'ethnie, le sexe, la carence oestrogénique et les antécédents familiaux sont des facteurs de risque important pour le développement d'une faible DMO.

2. Les facteurs de risques exogènes :

- Les facteurs de risques liés aux chutes

Il existe un certain nombre de facteurs de risques pouvant entraîner des fractures liées aux chutes. Des troubles neurologiques (comme la maladie de Parkinson) ou une mauvaise vue (cataracte) peuvent être associés à un risque de chutes (John A. Kanis & McCloskey, 1998).

- Les facteurs de risques liés au style de vie

Il existe beaucoup de facteurs pouvant influencer sur le capital osseux parmi lesquels le tabagisme, le manque d'activité physique, la prise d'alcool ou encore une nutrition mal adaptée (Tanriover et al., 2010).

Il existe de nombreux composés nutritionnels (macronutriments et micronutriments) pouvant influencer sur le capital osseux. Ce point sera développé un peu plus bas dans le Chapitre *Prévention nutritionnelle de l'ostéoporose*.

6. TRAITEMENT DE L'OSTÉOPOROSE ET PREVENTION DES FRACTURES

1. Pharmacothérapie

Ces trente dernières années, un vaste éventail de traitements pharmacologiques s'est développé pour limiter les altérations osseuses et leurs comorbidités. Ces traitements pour la prévention et le traitement de l'ostéoporose visent à empêcher cette perte osseuse excessive soit en inhibant la résorption osseuse (traitement antirésorptif) (bisphosphonates) soit en augmentant la formation osseuse (traitement anabolique) (raloxifène, strontium ranelate) (Das & Crockett, 2013; Rachner, Khosla, et Hofbauer, 2011).

Les traitements les plus utilisés en Europe sont : le raloxifène, les bisphosphonates, le ranélate de strontium (J. A. Kanis et al., 2008). Voici une liste non exhaustive des traitements. Dans ce chapitre, nous traiterons en particulier de la cible d'action de ces traitements (Figure 19).

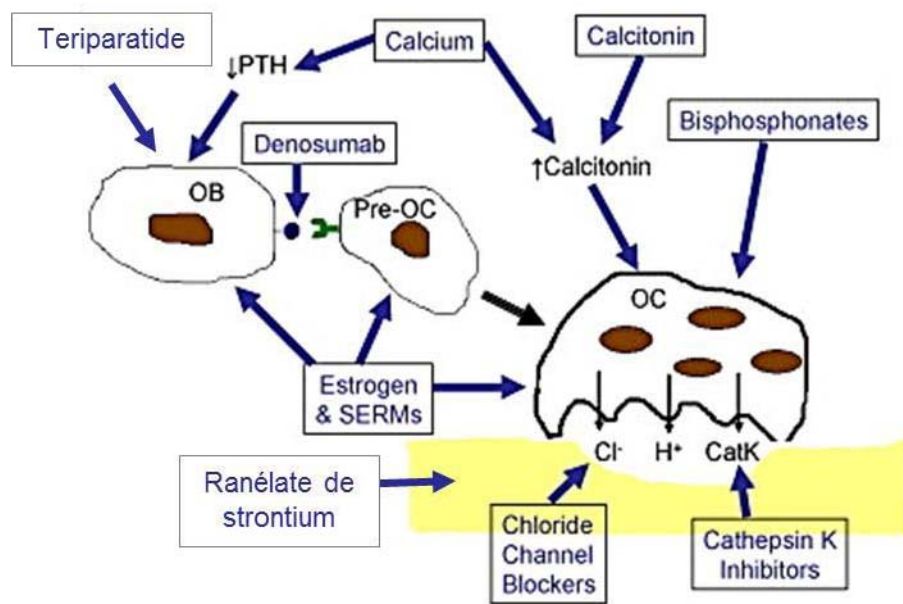


Figure 19: Mécanisme d'action des traitements disponibles pour l'ostéoporose. Adapté de Ian R. Reid (2008)

I. Traitements anti-résorptif

Les traitements anti-résorptif agissent en ciblant l'ostéoclaste, réduisant ainsi l'impact de la résorption osseuse chez les patients ostéoporotiques. L'efficacité de ces traitements se traduit par une réduction de la porosité corticale et une restauration de la microarchitecture trabéculaire, ainsi, ces médicaments peuvent augmenter la DMO de 2 à 10% (mesure DXA) (Eriksen, 2012).

- Le traitement hormonal substitutif

Comme nous l'avons décrit plus haut, la perte osseuse post-ménopausique est essentiellement causée par le déficit en œstrogènes (Figure 19). Le traitement hormonal substitutif évite donc cette perte osseuse accélérée et permet de réduire le risque de fractures. Toutefois, en raison d'un rapport bénéfice/risque jugé défavorable, il n'est plus proposé en première intention dans le cadre de la prise en charge de l'ostéoporose car il augmenterait de manière modérée le risque de cancer du sein (Ian R Reid, 2002).

- Les modulateurs sélectifs du récepteur des œstrogènes (SERM)

Les modulateurs sélectifs des récepteurs des œstrogènes (SERM) sont des agents non stéroïdiens qui comme leur nom l'indique se lient au récepteur des œstrogènes afin d'agir comme agonistes ou antagonistes des œstrogènes (Nelson, Wardell, & McDonnell, 2013). Le tamoxifène, est à la fois un antagoniste aux œstrogènes dans le sein, est un agoniste partiel sur l'os (J. A. Kanis et al., 2008). Il permet de réduire le taux de perte osseuse chez les femmes ménopausées. Le raloxifène prévient la perte osseuse et réduit le risque de fractures vertébrales.

Parmi les SERMs le Raloxifène est le produit anti-ostéoporotique le plus commercialisé. Il améliore la DMO chez les femmes ménopausées et a été approuvé par la FDA pour une utilisation dans la prévention de l'ostéoporose chez les femmes ménopausées. Néanmoins, la prise de Raloxifène est associée à une augmentation du risque de maladies thromboemboliques mais pas de pathologies cardiaques ni de cancer du sein (Barrett-Connor et al., 2006; Kanakamani & Tandon, 2008).

- Les Bisphosphonates

Les bisphosphonates sont les traitements anti-résorptifs les plus utilisés pour le traitement de l'ostéoporose. Ils possèdent une forte affinité pour les cristaux d'hydroxyapatite de l'os. Ce sont de puissants inhibiteurs de la résorption osseuse.

Ils possèdent deux mécanismes d'action : 1) ils se lient aux cristaux d'hydroxyapatite ; 2) ils inhibent d'importantes voies métaboliques dans les ostéoclastes une fois internalisés, ce qui entraîne leur apoptose (Eriksen, 2012). Les bisphosphonates inhibent l'adénosine triphosphatase (ATPase) et altèrent le cytosquelette des ostéoclastes (Ian R. Reid, 2008) (Figure 19).

Les bisphosphonates oraux sont associés à des troubles gastro-intestinaux légers, mais globalement ils font preuve d'une bonne tolérance avec une bonne efficacité. L'alendronate est le bisphosphonate le plus prescrit pour le traitement de l'ostéoporose post-ménopausique. Il est associé à une augmentation de la BMD et à une réduction du risque de fracture (J. A. Kanis et al., 2008). D'autres anti-résorptifs existent, mais ils sont bien moins prescrits et possèdent des effets secondaires plus importants.

- Denosumab

Le Denosumab, un anticorps monoclonal bloquant dirigé contre RANKL. Ainsi, RANKL ne peut plus interagir avec son récepteur RANK à la surface des ostéoclastes (Figure 19). Leur différenciation est alors bloquée et la résorption osseuse diminuée. Ce traitement est utilisé chez les femmes post-ménopausées mais aussi pour les hommes ayant un fort risque de fractures.

- Calcitonine

La calcitonine est une hormone polypeptidique endogène qui inhibe directement et transitoirement l'activité de résorption des ostéoclastes en se liant au récepteur de la calcitonine sur les ostéoclastes et la fonction de suppression. En effet, le récepteur à la calcitonine est exprimé par les ostéoclastes en maturation. La fixation de l'hormone sur le CTR entraîne un blocage de la maturation et une inhibition de l'activité de résorption. La calcitonine augmente modérément la DMO au niveau du rachis lombaire et de l'avant-bras (J. A. Kanis et al., 2008). Cette hormone peut également produire de petites augmentations de la masse osseuse, en particulier pendant les premières années après la ménopause, lorsque le renouvellement osseux est élevé (Deal, 1997). La calcitonine a récemment été retiré du marché en Europe en raison de préoccupations concernant le cancer lors d'une utilisation à long terme (Lim & Clarke, 2012).

2. Traitements anabolisants

Les traitements anabolisants visent à stimuler la formation osseuse en optimisant la fonction ostéoblastique.

- Tériparatide

Le Tériparatide est un fragment recombinant 1-34 de la PTH et possède un effet anabolique lorsqu'il est administré à faibles doses. Il possède deux mécanismes d'action : dans l'os spongieux où le taux d'apoptose des ostéoblastes est élevé, la PTH conduit à une diminution de l'apoptose des ostéoblastes ; dans l'os périostique où le taux d'apoptose des ostéoblastes est faible, la PTH augmente la survie des pré-ostéoblastes (Gallagher & Sai, 2010). Ainsi, il augmente le remodelage osseux au bénéfice de la formation. Il induit une augmentation de la DMO et une diminution de l'incidence des fractures vertébrales et non vertébrales.

Le Tériparatide est efficace en augmentant la BMD chez les femmes ménopausées et chez les personnes ayant une ostéoporose induite par les glucocorticoïdes. Le Tériparatide est approuvé par la Food and Drug Administration (Yu et al., 2011).

Les conséquences de la prise de Tériparatide sont une hypercalcémie légère, une hypercalciurie, une hyperuricémie, des nausées, des crampes dans les jambes et des vertiges (Kanakamani & Tandon, 2008).

- Ranélate de strontium

Le Ranélate de strontium est un agent oral qui à la fois diminue la résorption et augmente la formation osseuse. Il est incorporé dans l'hydroxyapatite par un atome de strontium en remplacement d'un atome de calcium. Il inhibe l'action des ostéoclastes en exerçant un effet sur le récepteur du calcium provoquant l'apoptose des ostéoclastes. In vitro, le strontium améliore la prolifération des ostéoblastes, augmente la phosphatase alcaline ainsi que la synthèse de collagène (Gallagher & Sai, 2010).

Le Ranélate de strontium augmente la BMD et réduit le risque de fractures (Collette et al., 2010). Son effet protecteur résulte d'un découplage entre la formation et la résorption osseuse, augmentant de ce fait les ostéoblastes fonctionnels tout en diminuant simultanément l'activité ostéoclastique.

La prise de Ranélate de strontium entraîne des nausées et des diarrhées. Celles-ci ont été rapportées au début du traitement et semblent disparaître ensuite.

Même si les traitements sont de plus en plus efficaces, ils présentent toutefois des effets secondaires parmi lesquels une intolérance gastro-intestinale aux bisphosphonates ou un risque augmenté de cancer du sein, de l'ovaire ou de l'endomètre (Ian R Reid, 2002; Yeh, 2007).

Il y a donc un besoin urgent de développer et de mettre en œuvre des approches et des politiques nutritionnelles pour la prévention et le traitement de l'ostéoporose qui pourrait,

avec le temps, offrir une base pour des stratégies de prévention fondées sur la population. De nombreux nutriments peuvent influencer sur la santé osseuse (Cashman, 2007).

2. Prévention de l'ostéoporose

La prévention de l'ostéoporose est corrélée avec le risque de fractures ostéoporotiques. En effet, même si l'on ne peut pas agir sur certains paramètres endogènes (comme l'âge, le sexe, les antécédents familiaux), on peut agir sur les paramètres environnementaux afin de diminuer le risque de fractures.

Ainsi, le comité d'expert du National Osteoporosis Foundation recommande l'arrêt du tabac et d'éviter l'usage abusif de l'alcool (Cosman et al., 2014). L'immobilité étant un facteur de risque important, il est alors recommander de pratiquer une activité régulière et du renforcement musculaire. La pratique d'une activité physique régulière provoque une stimulation mécanique du tissu osseux et contribue à ralentir la perte de masse osseuse et de masse musculaire après la ménopause et chez les personnes âgées. Parallèlement, plus de 90% des fractures de la hanche sont causées par des chutes, la plupart à la maison. La prévention du risque de chute, notamment via l'activité physique, est donc un facteur majeur à prendre en considération (Cesarec, Martinec, Basic, & Jakopic, 2014; Hernlund et al., 2013; J. A. Kanis et al., 2008).

Sur le plan nutritionnel, la plupart des femmes ménopausées ont de faibles apports en calcium et en vitamine D. Une supplémentation est alors très souvent prescrite en plus des traitements classiques (Chapuy, Arlot, Duboeuf, Brun, Crouzet, Arnaud, et al, 1992; Dawson-Hughes, Harris, Krall, et Dallal, 1997; Meunier, Delmas, Eastell, McClung, Papapoulos, Rizzoli, et al, 1999). Cet exemple illustre le rôle potentiel que peut jouer la nutrition dans le développement et le maintien de la santé osseuse. Ainsi, la correction des carences en éléments constitutifs du squelette est une approche élémentaire pour un vieillissement réussi nous verrons un peu plus loin que ce n'est pas la seule.

7. PREVENTION NUTRITIONNELLE DE L'OSTEOPOROSE

L'approche nutritionnelle la plus connue est l'utilisation du couple calcium/Vitamine D3. Elle repose sur la fourniture et l'optimisation de l'emploi d'un élément constitutif : le calcium. Néanmoins, il existe d'autres approches qui combinent à la fois l'utilisation de potentiels anti-inflammatoire, antioxydants ou de modification de la signalisation cellulaire.

1. Micronutriments

1. Calcium

Le corps humain adulte contient 1000 à 1200 g de calcium dont environ 99% sont localisés dans les os sous forme d'hydroxyapatite cristallisée. Le calcium possède un rôle structural dans le tissu osseux car il est le constituant majoritaire

de la matrice osseuse minéralisée. Un apport adéquat est nécessaire pour la croissance et l'atteinte du pic de masse osseuse ainsi que le maintien de cette masse tout au long de la vie.

Le calcium est absorbé dans l'intestin par deux processus passifs et actifs, la voie active nécessite l'intervention de la vitamine D. C'est pour quoi une bonne santé osseuse nécessite des apports satisfaisants en calcium et vitamine D. Un apport en calcium de 900 mg par jour pour un adulte est nécessaire au maintien de la densité minérale osseuse. En France, il est conseillé aux femmes ménopausées et aux hommes de plus de 65 ans de consommer quotidiennement 1200 mg de calcium par jour (Martin, 2001). En 2010, une étude a démontré que la consommation de calcium alimentaire chez la femme ménopausée de plus de 45 ans est bien en dessous de celle recommandée par les directives nationales, et que cette faible consommation est particulièrement associée à un risque ostéoporotique et fracturaire (Fardellone et al., 2010). 30% du calcium ingéré par jour est absorbé par l'intestin grêle et dans une moindre mesure dans le côlon.

Par ailleurs, l'importance de ces apports est également soulignée dans des populations plus jeunes, à savoir que des apports faibles en Ca sont associés à un pic de masse osseuse plus faible et un risque accru de développer plus tard un tableau ostéoporotique (Black, Williams, Jones, & Goulding, 2002; Boot, de Ridder, Pols, Krenning, & de Muinck Keizer-Schrama, 1997).

2. Vitamine D

La vitamine D est le second élément clé essentiel pour le capital osseux et sous sa forme 1,25-dihydroxyvitamine D₃, elle assure deux fonctions principales: elle contribue à une minéralisation optimale des tissus minéralisés pendant et après la croissance et au maintien de l'homéostasie calcique. Elle contribue à l'absorption du calcium au niveau intestinal. Un apport de 10 à 15 µg par jour est conseillé (Martin, 2001).

Le taux approprié de vitamine D sérique est approximativement situé entre 30 et 55 ng/ml. Les personnes présentant des valeurs situées en dessous de 20 ng/ml sont considérées comme déficientes et faibles pour un taux compris entre 20 et 30 ng/ml (Labronici et al., 2013). Au cours de ces dernières années, la carence en vitamine D est apparue comme un facteur de risque très important de fractures ostéoporotiques, en particulier celle de la hanche (Eriksen, 2012). En effet, des patients présentant une fracture de la hanche ont généralement les taux les plus bas de vitamine D chez tous les groupes de patients étudiés. Par ailleurs, la carence en vitamine D cause non seulement des os plus « faibles », mais aussi une atteinte musculaire importante entraînant une perte de force musculaire et consécutivement une moindre stimulation mécanique de l'os et une propension accrue des chutes (Glerup et al., 2000; Pfeifer, Begerow, & Minne, 2002).

Une augmentation significative de la densité osseuse au niveau de la hanche est observée suite à une supplémentation en calcium et vitamine D. En revanche, elle ne réduit pas le risque de fractures et augmente le risque de calculs rénaux chez les femmes ménopausées (Jackson et al., 2006).

Par ailleurs, bien que le calcium et la vitamine D soient des composés reconnus pour avoir un effet préventif sur la perte de masse osseuse, d'autres facteurs nutritionnels non calciques ont été mis en évidence et semblent aussi efficaces dans l'acquisition et le maintien de la masse osseuse au cours de la vie.

3. Les polyphénols

Les polyphénols sont des molécules de défense des plantes retrouvées en abondance dans les fruits, les légumes, les céréales, les légumes secs, le chocolat et les boissons, comme le thé, le café ou le vin. Durant la décennie passée, plusieurs études ont permis de démontrer que l'hespéridine des agrumes (Habauzit et al., 2009), les catéchines du thé vert (C.-L. Shen, Yeh, Cao, & Wang, 2009), fisétine (flavonoïde contenu dans la fraise) (Léotoing et al., 2013) ou encore les polyphénols contenus dans l'huile d'olive (C. Puel et al., 2008; C Puel et al., 2004) ou la grenade (Spilmont et al., 2014) contribuent à limiter la perte osseuse dans des modèles animaux.

Leurs propriétés anti-oxydantes et anti-inflammatoires sont capables de moduler le métabolisme osseux en agissant sur les ostéoblastes et les ostéoclastes (Gonzalez et al., 2011; Rao, Rao, & Kang, 2012 ; Villarreal et al., 2007). L'hydroxytorosol de l'huile d'olive (Hagiwara, Goto, Araki, Miyazaki, & Hagiwara, 2011), la lutéoline (flavonoïde contenu dans le céleri ou le persil (T.-H. Kim et al., 2011) ou les polyphénols de pruneau (Bu et al., 2008) inhibent l'ostéoclastogénèse tandis que les polyphénols du thé vert (Yun et al., 2007) induisent l'apoptose des ostéoclastes. À l'inverse, les polyphénols ont aussi la capacité de stimuler la fonction ostéoblastique en augmentant l'activité de facteur de transcription cruciaux tels que Runx2 ou Ostérix (Léotoing et al., 2013 ; Spilmont et al., 2014; Trzeciakiewicz, Habauzit, & Horcajada, 2009).

4. Vitamine C

La vitamine C ou acide ascorbique est un micronutriment essentiel pour diverses fonctions biologiques. Une carence grave en vitamine C peut conduire au développement du scorbut, un état pathologique caractérisé par une fragilisation des vaisseaux sanguins des tissus conjonctifs d'une manière générale. En France, les apports nutritionnels conseillés en vitamine C sont de 110 mg/jour pour un adulte et de 120 mg/jour pour une personne âgée (Martin, 2001). Néanmoins, ces normes sont régulièrement discutées et une étude récente estime que l'apport optimal en vitamine C se situerait autour de 200 mg par jour afin de maximiser son effet bénéfique sur la santé (Frei, Birlouez-Aragon, & Lykkesfeldt, 2012).

L'étude Framingham a montré qu'une consommation élevée en vitamine C est associée à une préservation de la densité minérale osseuse (Sahni et al., 2009). De façon cohérente, plusieurs études épidémiologiques ont montré qu'un taux sérique faible en acide ascorbique est associé à un risque accru de fractures de la hanche chez les fumeurs (Zhang et al., 2006) et les femmes présentant déjà un tableau ostéoporotique (Maggio et al., 2003). Sur le plan interventionnel, une supplémentation en vitamine C montre un effet bénéfique sur la DMO (Leveille et al., 1997; Simon & Hudes, 2001) en particulier chez les femmes ménopausées supplémentées en calcium et ayant recours au traitement hormonal substitutif (Morton, Barrett-Connor, & Schneider, 2001).

Au niveau tissulaire, l'acide ascorbique joue un rôle critique lors de la biosynthèse de la matrice collagénique. Il sert de cofacteur aux hydroxylases responsables de l'hydroxylation des résidus lysine et proline et contribue par voie de conséquence à la formation et la stabilisation de la triple hélice (Du, Cullen, & Buettner, 2012; Murad et al., 1981). En son absence, les hydroxylases sont inhibées entraînant alors une synthèse défectueuse du collagène et une fragilisation de la matrice (Grosso et al., 2013; Xing, Pourteymoor, & Mohan, 2011).

L'acide ascorbique intervient également dans l'induction la différenciation de cellules mésenchymateuses en ostéoblastes notamment en augmentant l'expression de la phosphatase alcaline, une enzyme clé dans le processus de minéralisation (Franceschi, Iyer, & Cui, 1994). Quant à l'effet de l'acide ascorbique sur les ostéoclastes, les données sont moins tranchées. Plusieurs études démontrent que l'acide ascorbique favorise et accélère l'ostéoclastogénèse (Le Nihouannen, Barralet, Fong, & Komarova, 2010; Otsuka, Kato, Hirose, & Hagiwara, 2000; Ragab, Lavish, Banks, Goldberg, & Greenfield, 1998; Tsuneto, Yamazaki, Yoshino, Yamada, & Hayashi, 2005). Néanmoins, d'autres équipes ont montré le contraire (Xiao et al., 2005).

Outre les micronutriments, les macronutriments ne sont pas restreints à leur seul rôle d'apport énergétique et peuvent impacter le métabolisme osseux.

2. *Macronutriments*

1. *Lipides*

Des méta-analyses récentes montrent que malgré la stimulation mécanique de l'os lors de l'établissement de l'obésité, les régimes hyperlipidiques ont un effet délétère sur la matrice osseuse (Zhao, Liu et al. 2007). Les effets de la nutrition lipidique sur le tissu osseux doivent être considérés tant sur le plan quantitatif que qualitatif. Des études cliniques et précliniques démontrent que l'effet sur le tissu osseux varie en fonction du degré de saturation et de la longueur des chaînes d'acides gras. Les modalités d'action des acides gras sont plurielles. Leurs effets peuvent être médiés via un récepteur nucléaire ou membranaire, une modification de la fluidité membranaire, de la synthèse de dérivés lipidiques (éicosanoïdes, docosanoïdes, céramides), une modulation de l'expression de facteurs de l'inflammation, d'adipokines ou encore du profil adipeux de la moelle osseuse. Le paramètre le plus décrit est une modulation du contexte inflammatoire. La littérature a largement liée l'apport lipidique et le statut inflammatoire, un protagoniste clé impliqué dans la résorption osseuse (Laneuville, Breuer et al. 1995; Mundy 2007). En fait, l'inflammation favorise la dégradation osseuse en stimulant l'activité des ostéoclastes, tout en inhibant la formation osseuse ostéoblastique entraînant un déséquilibre du remodelage osseux et une perte osseuse. A ce propos, les acides gras présentent une dualité d'action. Les acides gras de la famille des ω -6 sont associés à une perte osseuse accrue, tandis que les ω -3 sont pressentis pour protéger le capital osseux (Corwin, Hartman et al. 2006; Calder and Yaqoob 2009). Parallèlement à la modulation du contexte inflammatoire, le rôle des récepteurs membranaires GPR40 et GPR120 semble prendre une place de plus en plus importante au sein des relations

qu'entretennent les cellules osseuses avec les lipides alimentaires : cet aspect a été particulièrement étudié au sein de notre équipe qui a été la première à monter le potentiel ostéoprotecteur du récepteur aux acides gras saturés : le GPR40.

2. Protéines

Les protéines alimentaires doivent représenter entre 10 et 15% de l'apport énergétique total. La consommation énergétique journalière. La dose quotidienne recommandée en protéines chez l'adulte est de 0,8 g par kg de poids corporel. Chez les personnes âgées, ce besoin est augmenté à 1g/ par kg de poids corporel et par jour et doivent représenter 15% de l'apport énergétique total (Martin, 2001).

Le renouvellement osseux s'effectue par cycle de dégradation puis synthèse. Les protéines de la matrice osseuse n'échappent pas à la règle. La synthèse s'effectue à partir d'un pool d'acides aminés qu'il faut maintenir disponible. Ainsi, l'ingestion et la digestion des protéines apportées par l'alimentation contribue à maintenir ce pool constant pour permettre le renouvellement de la trame organique osseuse (Conigrave, Brown, & Rizzoli, 2008) et un apport suffisant en protéine est nécessaire au métabolisme osseux pour optimiser l'acquisition du pic de masse osseuse pendant la croissance et ralentir la perte osseuse associée au vieillissement (Jean-Philippe Bonjour, Chevalley, Amman, & Rizzoli, 2015).

Que connaissons-nous du fonctionnement ?

Un apport protéique favorise la libération d'insuline par le pancréas et d'IGF1 par le foie. L'IGF-1 est un facteur essentiel pour la croissance osseuse longitudinale et exerce des effets anabolisants sur la masse osseuse à l'âge adulte. Il augmente le métabolisme phosphocalcique et la production rénale de calcitriol (Conigrave et al., 2008). Par ailleurs, selon Karaguzel and Holick (2010), il stimule les ostéoblastes et ainsi maintient l'activité du remodelage osseux. Au-delà du remodelage osseux, un taux suffisant d'IGF1 maintient la masse musculaire et la force, déterminants importants du risque de chute chez les personnes âgées (Conigrave et al., 2008). Outre la stimulation de la production d'IGF-1, l'apport en protéines permet d'augmenter l'absorption intestinale du calcium (Conigrave et al., 2008 ; Mangano, Sahni, & Kerstetter, 2014) et de réduire l'excrétion urinaire de N-télopeptide de collagène et de désoxypyridinoline (R. Rizzoli et al., 2014) (Figure 20).

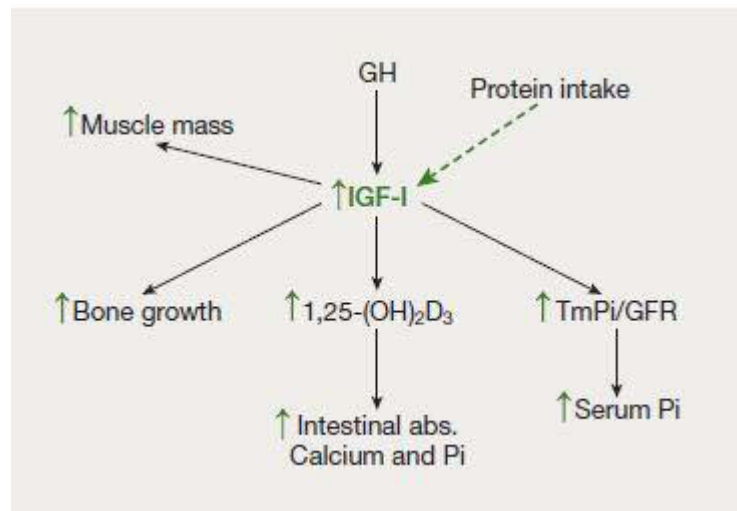


Figure 20 : Effet de l'ingestion de protéines sur la production d'IGF-1.

L'ingestion de protéines possède un impact positif sur la santé osseuse en augmentant la masse musculaire, en favorisant l'absorption du calcium, en supprimant la PTH, et en augmentant la production de l'insulin-like Growth factor-I (IGF-I). Abréviations: abs, absorption; GH, Growth Hormone; IGF-I, Insulin-like Growth Factor I; Pi, phosphate inorganique; TmPi/GFR, réabsorption rénale de Pi. D'après www.medicographia.com/wp-content/pdf/Medicographia111.pdf

L'effet d'un régime riche en protéines fait encore débat. En effet, l'augmentation de l'apport protéique peut augmenter la production d'acide lors de l'oxydation d'acides aminés (Conigrave et al., 2008). Il est suggéré qu'un apport excessif en protéines animales pourrait être délétère en cas d'absence d'aliments alcalinisant associés. En effet, le métabolisme des protéines conduit à une production endogène d'ions H⁺, acidifiants, surtout si la fonction rénale est un peu altérée (avec l'âge). Néanmoins, les données de l'étude Framingham démontre qu'un taux plus élevé de protéines animales ne semble pas affecter la masse osseuse dans la population âgée (Hannan et al., 2000).

L'importance de la source de protéines sur les effets positifs ou supposés négatifs est également débattue. Les travaux de Frassetto (2000) suggèrent que la relation entre les taux de fracture de la hanche et l'ingestion de protéines est positivement liée à la consommation de protéines animales et inversement liée à la consommation de protéines végétales. Néanmoins, l'étude MESA (Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis) montre que si la consommation de protéines végétales est positivement corrélée à la BMD, l'association entre la consommation de protéine animale et une moindre qualité du tissu osseux n'est pas relevante (Hu et al., 2014).

En conclusion, la plupart des études suggèrent un effet bénéfique des protéines sur le tissu osseux. Toutefois, le rôle des protéines semble complexe. Il est probable que cet effet soit en partie dépendant de la présence d'autres composés nutritionnels (micro ou macronutriments) (Jesudason & Clifton, 2011; Thorpe & Evans, 2011; Tucker, Hannan, &

Kiel, 2001). Par ailleurs, la valeur nutritive des protéines est influencée par plusieurs facteurs notamment leur composition en acides aminés, leur digestibilité, la cinétique de leur digestion et leur capacité à transférer les acides aminés pour leur synthèse protéique.

Ainsi, les protéines jouent un rôle dans le maintien de l'intégrité de l'os et sont une composante importante du squelette (René Rizzoli, Ammann, Chevalley, & Bonjour, 2001). C'est notamment le cas du collagène de type I dont l'influence sur les mécanismes de remodelage osseux se présente comme une thématique montante ces dernières années.

LE COLLAGÈNE

1. COLLAGÈNE ENDOGÈNE: UN ÉLÉMENT CONSTITUTIF DE L'OS

Le collagène est la protéine la plus abondante retrouvée chez les mammifères et représente près de 30% de leur masse totale en protéines. Le collagène constitue l'élément structural majeur de tous les tissus conjonctifs et de la matrice extracellulaire. Le terme de « collagène » désigne une grande famille de protéines dont la taille est en constante augmentation. A ce jour, vingt-neuf types de collagènes différents ont été identifiés (Gordon & Hahn, 2010; Soderhall et al., 2007).

En fonction de leur structure moléculaire et de leur mode d'assemblage, ils peuvent être divisés en plusieurs catégories. Celles-ci incluent les collagènes fibrillaires, les collagènes associés aux fibrilles (Fibril-Associated Collagens with Interrupted Triple helices ou FACIT), les collagènes associées aux membranes avec triples hélices interrompues (Membrane-Associated Collagens with Interrupted Triple helices ou MACIT), les collagènes « MULTIPLEXIN » (multiple triple helix domains and interruptions) et les collagènes formant des réseaux (Network forming) (Shoulders & Raines, 2009). Ces catégories de collagènes sont détaillées dans le tableau en annexe de l'article 1.

Environ 90% du collagène présent dans le corps est constitué de collagène fibrillaire (type I, II, III, V, XI, XXIV et XXVII) (Gelse, 2003). Tous collagènes confondus, le collagène de type I est le plus abondant garantissant à la plupart des tissus et des organes leur forme et leur stabilité (Yamauchi & Sricholpech, 2012). Le collagène de type I est présent dans le derme, les tendons, les ligaments et les os. A lui seul, il représente 80% des protéines totales de l'os. De plus, environ 95% du collagène contenu dans le tissu osseux est du collagène de type I (Sanguineti, Puddu, Mach, Montecucco, & Viviani, 2014). Les collagènes de type III, de type V (Kahai, Vary, Gao, & Seth, 2004), de type VI (Keene, Sakai, & Burgeson, 1991), et de type X (Rosati et al., 1994) sont également présents dans l'os, mais dans une moindre mesure. Les collagènes de type II et XXVII sont présents dans le cartilage et participe à l'ossification endochondrale (Álvarez, Balbín, Santos, Fernández, Ferrando, et López, 2000; Aszódi, Chan, Hunziker, Bateman, et Fässler, 1998) (Hjorten et al., 2007).

1. Unité de base structurelle du collagène de type I

Ramachandran et Kartha (1954) ont été les premiers à décrire la conformation du collagène. Cette protéine fibreuse est formée de trois chaînes polypeptidiques parallèles (appelées chaînes α) formant une hélice gauche de type *polyproline II like*, décalées d'un résidu par rapport à l'autre pour former une triple hélice droite (Gelse, 2003; Shoulders & Raines, 2009).

L'unité structurale du collagène de type I est constituée de deux chaînes identiques $\alpha 1(I)$ et d'une chaîne $\alpha 2(I)$. Les triples brins s'assemblent alors en polymères appelés fibrilles de collagène, qui s'associent à leur tour en faisceaux plus épais, les fibres de collagène.

La chaîne α du procollagène est constituée d'un domaine de collagène ininterrompu et de deux domaines non collagéniques aux extrémités (Figure 21). Ce domaine collagénique se compose d'une séquence répétée de 338 triplets Glycine-X-Y (Exposito, Valcourt, Cluzel, & Lethias, 2010) où la glycine se trouve tous les 3 résidus environ et la proline (Pro) et la 4-hydroxyproline (Hyp) se trouve sur les positions X et Y à la fréquence de 28% et 38%, respectivement (S. Ricard-Blum, 2011; Shoulders & Raines, 2009). Selon les travaux de Ramshaw, Ramshaw, Shah, and Brodsky (1998), le triplet le plus fréquemment observé est Gly-Pro-Hyp (10,5%).

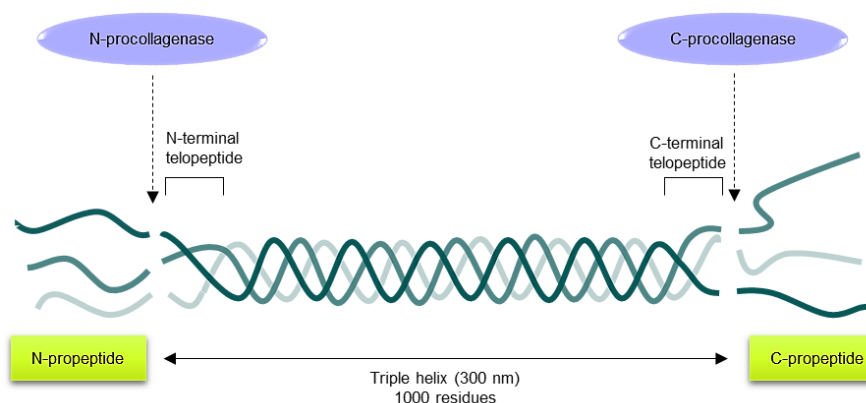


Figure 21 : La triple hélice de collagène.

Dans les collagènes fibrillaires, l'arginine (Arg) et la méthionine (Met) se retrouvent préférentiellement dans la position Y, tandis que la phénylalanine (Phe), la leucine (Leu) et le glutamate (Glu) se retrouvent préférentiellement dans la position X (Persikov, Ramshaw, Kirkpatrick, & Brodsky, 2002). La distribution de certains acides aminés (Lysine, Glutamine ou Arg) montre une périodicité de 18 résidus (Ottani, Martini, Franchi, Ruggeri, & Raspanti, 2002; Ramshaw et al., 1998).

La longueur de la partie en triple hélice varie considérablement entre les différents types de collagènes. La triple hélice du collagène de type I mesure environ 300 nm de longueur avec un diamètre d'environ 1,5 nm (Exposito et al.,

2010; Ottani et al., 2002). Chaque chaîne α contient 1050 acides aminés : la séquence répétée du domaine collagénique (soit 1014 acides aminés) plus deux domaines non collagéniques (Lodish et al., 2000).

La triple hélice est stabilisée par des liaisons hydrogène entre les différentes chaînes (Jordanie et Speakman, 1965; Ramshaw, Shah, et Brodsky, 1998) et par hydratation (De Simone, Vitagliano, et Berisio, 2008; Ramshaw, Shah, et Brodsky, 1998). Dans chaque triplet Gly-X-Y, le groupe amine (NH_2) de la glycine forme une liaison hydrogène avec le groupe carbonyle du résidu X de la triple hélice adjacente : $\text{NH}_{(\text{Gly})}-\text{C}=\text{O}_{(\text{X})}$ (Brodsky & Ramshaw, 1997) (Figure 22).

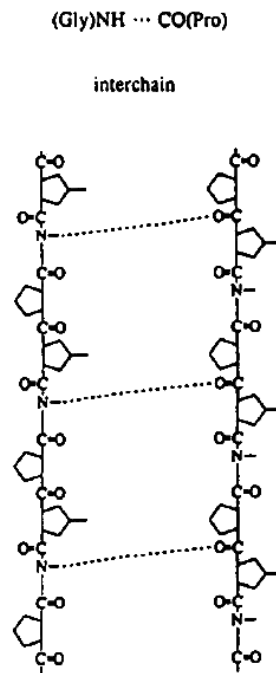


Figure 22 : Schéma illustrant les liaisons hydrogènes trouvées à l'intérieur de la triple hélice. D'après Brodsky and Ramshaw (1997)

2. Synthèse du collagène

La biosynthèse de la triple hélice débute dans la lumière du réticulum endoplasmique rugueux (RER) de l'ostéoblaste. Chaque chaîne α (appelée aussi *protocollagène*) est synthétisée sous la forme d'un précurseur constitué d'un propeptide N-terminal suivi d'un N-télopeptide non hélicoïdal, d'une hélice centrale, d'un C-télopeptide non hélicoïdal et d'un propeptide C-terminal (Figure 23).

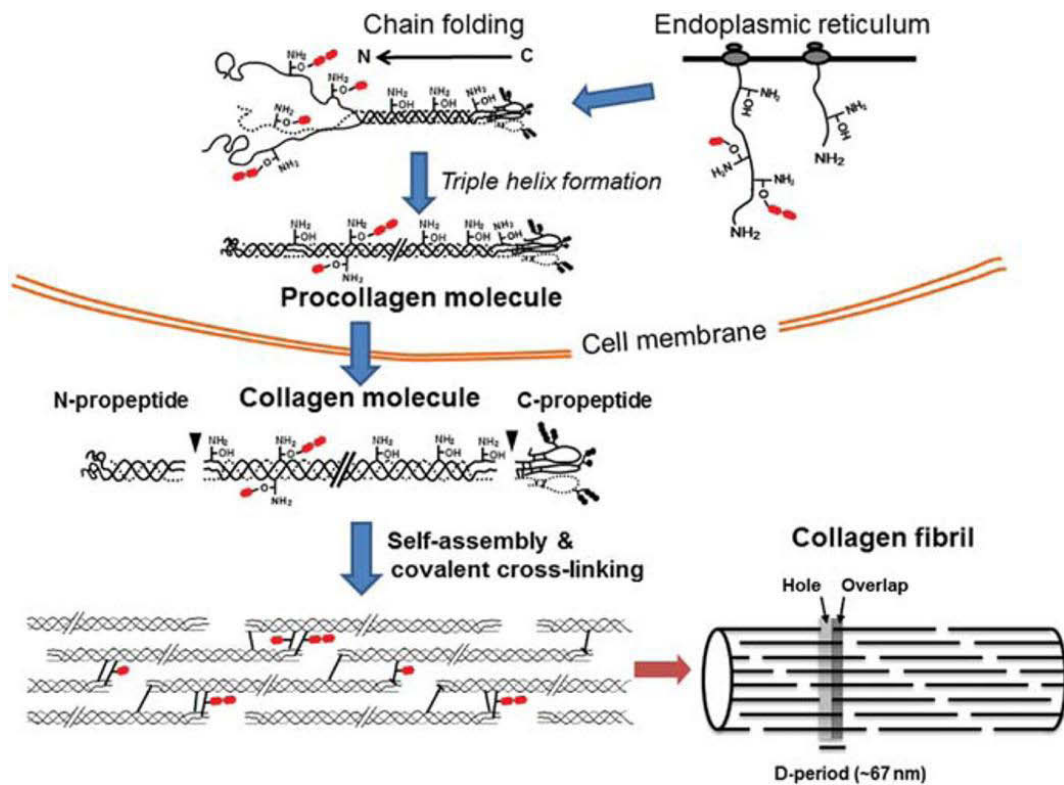


Figure 23: Biosynthèse du collagène de type I. La partie supérieure de la figure (au-dessus de la membrane cellulaire) illustre les événements intracellulaires et la partie inférieure de la figure (en dessous de la membrane cellulaire) illustre les événements extracellulaires. Au cours de la synthèse des chaînes de procollagène dans le RER, elles subissent des modifications post traductionnelles. Après ces modifications deux chaînes $\alpha 1$ et une chaîne $\alpha 2$ s'associent avec l'autre pour former la triple hélice qui sera sécrétée dans l'espace extracellulaire. Ensuite, les deux extrémités N- et C-propeptides sont clivés pour libérer la molécule de collagène. Les molécules de collagène sont ensuite spontanément auto-assemblées en fibrilles et stabilisées par des liaisons covalentes intra- et intermoléculaires. D'après Yamauchi and Sricholpech (2012)

Dans le RER, les chaînes α de procollagène subissent une série de réactions de transformations comme l'hydroxylation des résidus Pro et Lys (Figure 23). Ces hydroxylations, essentielles pour la structure et la fonction du collagène, sont catalysées par des enzymes, la 2-prolyl-4hydroxylase et la lysyl-hydroxylase (Ryhanen & Kivirikko, 1974). Les chaînes sont aussi glycosylées dans le complexe RER/Golgi (des résidus de galactose et de glucose sont ajoutés sur les résidus hydroxylysine ; Hyl). Des liaisons disulfures intrachaînes entre les séquences N- ou C-terminales des différentes chaînes α permettent de les aligner avant la formation du *procollagène* (triple hélice). Ainsi, la partie centrale des chaînes α se « zippe » à partir du côté C-terminal jusqu'à la partie N-terminale (Lodish et al., 2000). Ces réactions

continuent jusqu'à ce que la triple hélice soit formée. Elles cessent une fois que les chaînes α sont assemblées et repliées en triple hélice (Kivirikko & Myllyla, 1985).

Une fois l'assemblage du procollagène terminé, il est sécrété dans l'espace extracellulaire. Seules les régions N- et C-terminales, appelées télépeptides, ne forment pas de structure hélicoïdale (Figure 22). Au cours de la maturation de la molécule de procollagène en collagène (encore appelé *tropocollagène*), les N- et C-propeptides sont clivés respectivement par les N- et C-procollagénases. L'excision de ces deux propeptides permet aux molécules de collagène de polymériser en fibrilles dans l'espace extracellulaire (Lodish et al., 2000). Par ailleurs, il est important de noter qu'une des caractéristiques fondamentale des collagènes fibrillaires est qu'ils sont solubles lorsqu'ils sont synthétisés. Ils deviennent insolubles lors du clivage des propeptides terminaux par les procollagénases (Kadler, Holmes, Trotter, & Chapman, 1996).

Les molécules de tropocollagène s'assemblent les unes aux autres en fibrilles avec un écart 40 nm. Les triples hélices sont placées parallèlement les unes par rapport aux autres et sont décalées de 67 nm (appelée D période), soit environ un quart de leur longueur (Lodish et al., 2000; Orgel et al., 2001; Ottani et al., 2002) (Figure 24). Lors de la minéralisation, les cristaux d'hydroxyapatite se déposent entre les molécules de collagène (Dominguez, Barbagallo, & Moro, 2005).

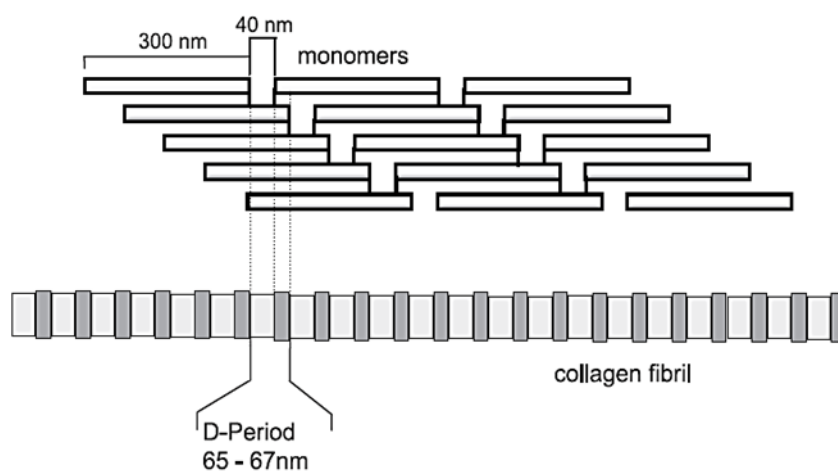


Figure 24: Représentation schématique de l'assemblage des fibrilles de collagène décalées en quinconce caractéristique du collagène. Les monomères mesurent 300 nm de long et sont écartés de 40 nm écarts. D'après Gelse (2003)

Les triples hélices sont liées entre elles de façon covalente par des molécules de pontage, réalisant un réseau fibrillaire. Immédiatement après la fibriollogénèse, les résidus lysine et hydroxyllysine situés au niveau des télépeptides peuvent être désaminés afin de produire des aldéhydes (Knott et Bailey, 1998). Ces aldéhydes situés au niveau des télépeptides, générés par la lysyloxidase, réagissent avec un autre aldéhyde ou un résidu lysine ou hydroxyllysine non modifié pour former les liaisons croisées intra- et intermoléculaires (Gelse, 2003; Kivirikko & Myllyla, 1985; Yamauchi &

Sricholpech, 2012) (Figure 25). Les liaisons croisées telles que l'hydroxylysyl-pyridinoline (appelée *pyridinoline*) et la lysyl-pyridinoline (appelée *déoxypyridinoline*) sont les liaisons croisées matures les plus connues.

La liaison pyridinoline est formée d'une hydroxylysine désaminée (Hyl^{ald}) issue d'un télopeptide et d'un résidu lysine issu d'une triple hélice adjacente. La liaison déoxypyridinoline est composée d'une Hyl^{ald} et d'un résidu lysine d'une triple hélice adjacente (Yamauchi & Sricholpech, 2012).

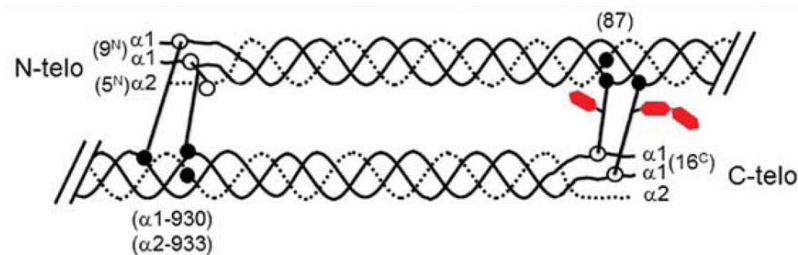


Figure 25: Formation de liaisons croisées lors de l'assemblage de molécules de collagène en fibrilles. D'après Yamauchi and Sricholpech (2012)

Cet analogue est relativement abondant dans les tissus minéralisés. Le degré de liaisons croisées est grandement variable et dépend du type de collagène, du tissu, de l'âge et de l'espèce (Gómez-Guillén, Giménez, López-Caballero, & Montero, 2011). Un des déterminants de la résistance et de la force de tension des fibrilles est le type et le nombre liaisons croisées intra- et intermoléculaires (Dominguez et al., 2005).

En stabilisant les fibrilles de collagène, les liaisons croisées intra- et intermoléculaires confèrent aux tissus conjonctifs leur résistance. Ils sont essentiels pour donner aux fibrilles la force de traction nécessaire pour jouer leur rôle structural (S Ricard-Blum & Ville, 1989). La déoxypyridinoline est présente seulement dans l'os et la dentine, tandis que la pyridinoline est également présente dans le cartilage. Ainsi, la pyridinoline et la déoxypyridinoline contribuent ainsi à la rigidité et à la solidité du tissu osseux (Romagnoli et al., 2011). Les pyridinolines et déoxypyridinolines, sont utilisés comme marqueurs urinaires de dégradation du collagène osseux pour le diagnostic de l'ostéoporose (Biver et al., 2012; Cuneo et al., 2010) (Robins, Duncan, Wilson, & Evans, 1996).

3. *Dégradation du collagène par les ostéoclastes*

L'acidification de la lacune de résorption par les ostéoclastes dissout la partie minérale de l'os, exposant la matrice collagénique à un certain nombre de protéases dont la cathepsine K, une cystéine protéase lysosomale, et les métalloprotéinases matricielles (MMP) sécrétées par les ostéoclastes matures (Garnero et al., 2003) (Figure 26). Durant ce processus de résorption osseuse, le collagène est clivé en plusieurs petits fragments à l'intérieur de la lacune de Howship.

1. Cathepsine K

La cathepsine K (CatK) est une cystéine protéase principalement exprimée dans les ostéoclastes. Elle contribue à la dégradation du collagène de l'os en attaquant les télépeptides du collagène, mais aussi le domaine central de la triple hélice sur plusieurs sites (Aguda et al., 2014) (Borel, Gineyts, Bertholon, & Garnero, 2012) (Figure 26). En condition *in vitro*, la CatK dégrade préférentiellement la matrice de collagène mature caractérisée par la présence de liaisons enzymatiques (liaisons pyridinium) et non enzymatiques (Borel et al., 2012).

2. Métalloprotéinases matricielles

Les métalloprotéinases matricielles (MMPs) sont des endopeptidases zinc-dépendantes (Nerenberg & Stultz, 2008). Elles régulent à la fois la croissance osseuse, la migration cellulaire et le remodelage de la matrice extracellulaire. Les ostéoclastes expriment plusieurs MMPs dont les MMP-1, -2, -9, -13 et -14 (Garnero et al., 2003; Nyman et al., 2011).

A titre d'exemple, les collagènes de type I et III contenus dans l'os sont préférentiellement clivés par la MMP-1 (ou collagénase interstitielle) et la MMP-8 (collagénase neutrophile). Mais ils sont aussi clivés par la MMP-2, la MMP-13 (collagénase 3) et la MMP-14 (ancrée à la membrane) (Figure 26). La MMP-2 peut cliver aussi le collagène de type I (Klein & Bischoff, 2011). Les 2 gélatinases (MMP-2 et MMP-9) clivent le collagène ayant été dénaturé sont dégradés (S. Ricard-Blum, 2011). Le mécanisme d'interaction entre les collagénases et le collagène n'est pas encore bien compris (Manka et al., 2012).

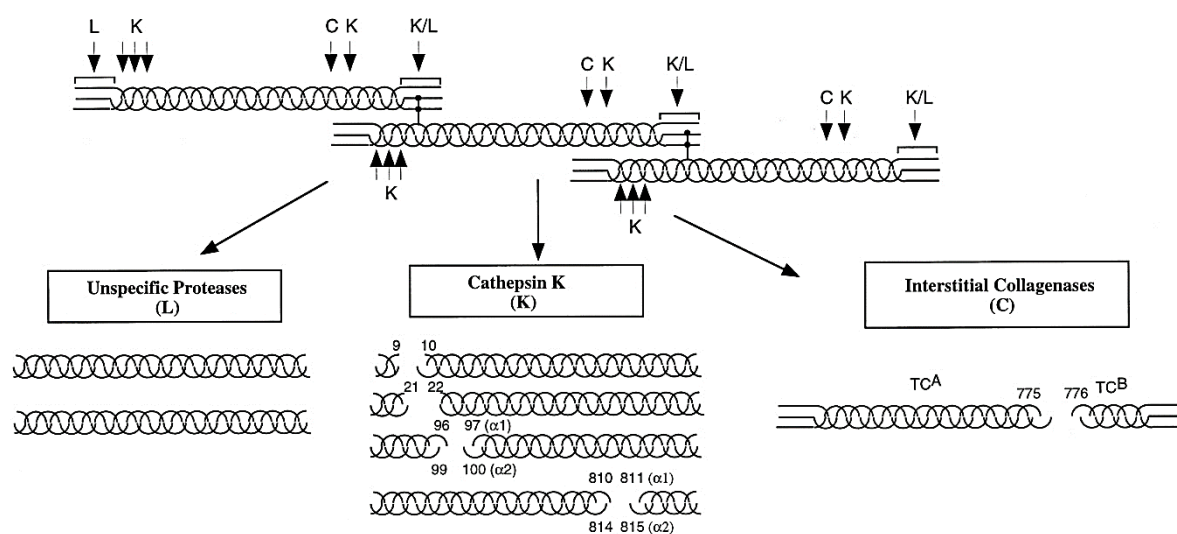


Figure 26 : Mécanisme de dégradation du collagène. Des protéases non spécifiques (telles que la cathepsine L ou B) (L) clivent le collagène seulement au niveau des télépeptides. Les collagénases interstitielles telles que les MMP-1, MMP-2, MMP-8, MMP-13 clivent la triple hélice sur un seul site (entre les acides aminés 775 et 776). La cathepsine K (K) clive quant à elle les molécules de collagène à la fois au niveau des télépeptides et de la triple hélice. D'après Garnero et al. (1998)

4. Relation collagène de type I et cellules osseuses

Les protéines de la matrice extracellulaire osseuse participent à la régulation du métabolisme des cellules osseuses notamment via leur attachement. Les intégrines constituent une famille de récepteurs présents sur les cellules osseuses, dont les ligands sont essentiellement les protéines de la matrice extracellulaire dont le collagène de type I. Ce sont des récepteurs d'adhésion cellulaire et sont impliqués à la fois dans les interactions cellules/cellules et cellules/matrice extracellulaire (Heino, 2000). Elles se comportent comme des senseurs qui permettent aux cellules osseuses de communiquer avec la matrice pour réguler l'activité cellulaire.

Les intégrines sont composées de deux sous-unités, α et β , deux protéines transmembranaires liées de façon non covalente (Siebers, ter Brugge, Walboomers, & Jansen, 2005) (Heino, 2000). Elles possèdent un large domaine extracellulaire (tête globulaire) et une petite queue cytoplasmique (Figure 27).

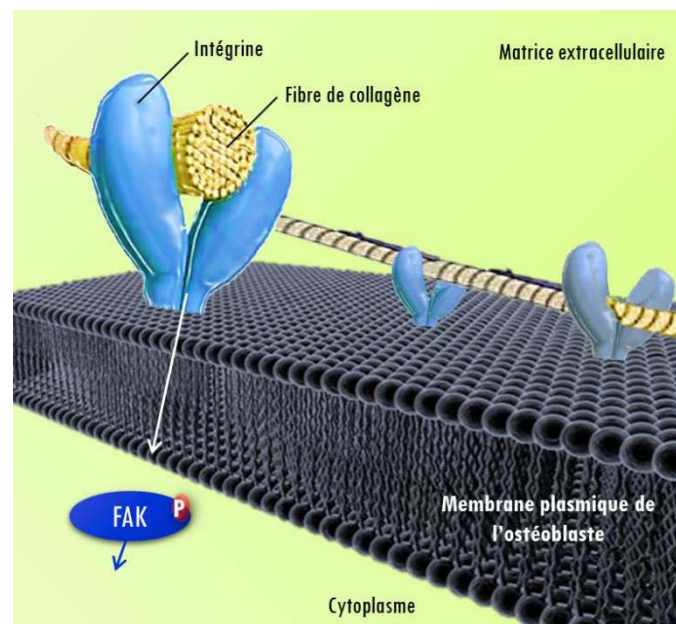


Figure 27: Communication entre l'ostéoblaste et la matrice extracellulaire (ostéoïde). Les fibres de collagène de type I sont reliées aux ostéoblastes par des intégrines. Les domaines cytoplasmiques des intégrines sont associés à des protéines kinases, comme la FAK (Focal Adhesion Kinase). La fixation du collagène à l'intégrine peut activer la FAK par autophosphorylation sur le résidu tyrosine 397 et mettre en route une cascade de signalisation qui transmet les signaux à travers la cellule.

Les intégrines ne se lient pas spécifiquement aux protéines de la matrice extracellulaire, elles se lient sur des sites spécifiques. Le site de liaison le plus connu est le tripeptide Arg-Gly-Asp (appelé RGD) mais il en existe d'autres qui peuvent être plus spécifiques. A titre d'exemple, la séquence DGEA (Asp-Gly-Glu-Ala) est la séquence de reconnaissance pour l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ sur le collagène (Siebers et al., 2005).

Les ostéoblastes expriment une large variété d'intégrines : les sous-unités $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 6$, αV , $\beta 1$, $\beta 3$, et $\beta 5$ (Siebers et al., 2005). L'expression de l'intégrine $\alpha V \beta 3$ est particulièrement notable dans la lignée ostéoclastique et son inhibition in vivo bloque la résorption osseuse mais les ostéoclastes expriment également les sous-unités $\alpha 2$ et $\beta 1$ (Duong, Lakkakorpi, Nakamura, & Rodan, 2000; Nesbitt, Nesbit, Helfrich, & Horton, 1993). Par ailleurs, les intégrines $\alpha 10 \beta 1$ et $\alpha 11 \beta 1$ ont été trouvées récemment et semble participer au métabolisme osseux et cartilagineux (White, Puranen, Johnson, & Heino, 2004). La majorité des signaux passe par la Focal Adhesion Kinase (FAK), une protéine qui s'auto-phosphoryle sur son résidu tyrosine 397 et active plusieurs voies de signalisation (J.-B. Kim et al., 2007) (Figure 27). La FAK permet d'activer la voie d'ERK1/2 (pour Extracellular Signal-Related Kinase) pour stimuler l'activité du facteur de transcription Runx2 dans les ostéoblastes (Roman M. Salaszyk, Klees, Williams, Boskey, & Plopper, 2007; Tamura et al., 2001). Elle est indispensable à la mécanotransduction (Castillo et al., 2012) et contribue au signaling des cytokines (Ray et al., 2012). Son invalidation au niveau des OB et des ostéocytes réduit la formation osseuse.

5. Rôle du collagène dans l'os

Nous venons de voir, que les protéines de la matrice extracellulaire osseuse régulent le métabolisme des cellules osseuses notamment par le biais d'une interaction récepteur/ligand. Mais le rôle du collagène ne s'arrête pas là.

Dans tous les tissus conjonctifs, le collagène possède des fonctions mécaniques, fournissant ainsi l'élasticité et la structure des tissus. Dans l'os, les molécules de collagène de type I sont impliquées aussi dans ses propriétés mécaniques.

Nous avons vu plus haut que lors de la minéralisation, le dépôt de cristaux d'hydroxyapatite se faisait à la fois entre et sur les fibres de collagène (Figure 28). Ces cristaux sont orientés dans la même direction que les fibrilles de collagène. Cette phase inorganique fournit à l'os sa rigidité, sa capacité à résister à la compression, tandis que la phase organique, constituée principalement de collagène de type I, fournit à l'os sa résistance, sa flexibilité, à savoir sa capacité à absorber l'énergie et à subir une déformation (Byrjalsen, Leeming, Qvist, Christiansen, & Karsdal, 2008; Viguet-Carrin, Garnero, & Delmas, 2006). Ainsi, la matrice collagénique contribue principalement à la robustesse de l'os (Viguet-Carrin et al., 2006).

La résistance osseuse s'explique, non seulement par l'interaction entre la phase minérale et de collagène, mais aussi par l'orientation des fibres de collagène selon leur direction (Figure 28). Différentes orientations de fibres de collagène peuvent être avantageuses pour résister à des forces mécaniques. Les régions où les fibres de collagène sont préférentiellement orientées transversalement résistent mieux aux forces de compression ; et les régions où le collagène est préférentiellement orienté de façon longitudinale résistent mieux à des forces de traction (Goldman, Thomas, Clement, & Bromage, 2005).

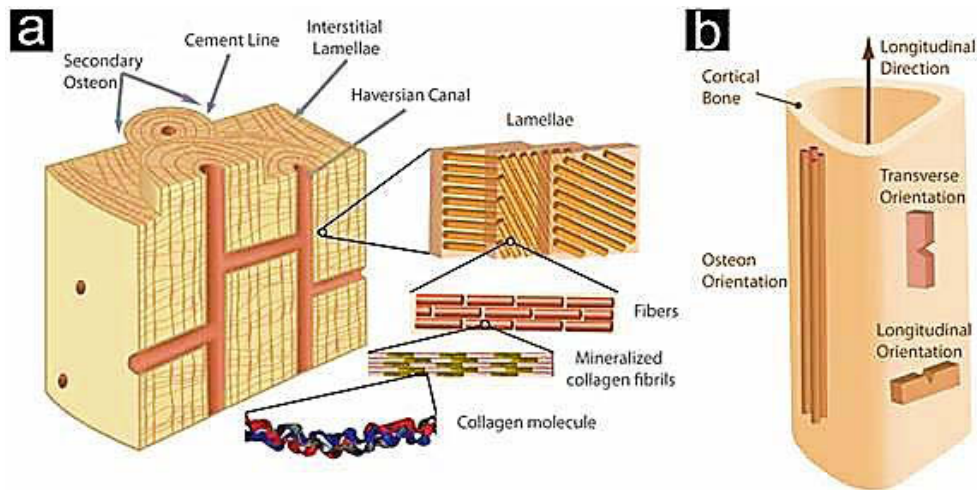


Figure 28 : Différentes orientations des fibres de collagène. (a) Les cristaux d'hydroxyapatite sont disposés entre les fibres de collagène. Les fibrilles de collagène minéralisées s'assemblent pour former des fibres qui elles-mêmes s'assemblent pour former des lamelles. Les lamelles sont disposées de manière concentrique autour d'un canal vasculaire central. Toute cette structure est appelée ostéon secondaire (~ 250 mm de diamètre) et elle est alignée parallèlement à l'axe longitudinal de l'os. (b) Dans l'orientation longitudinale, la fente est parallèle à l'orientation des ostéons tandis que dans le sens transversal, la fente est perpendiculaire à l'orientation des ostéons. D'après <http://www2.lbl.gov/ritchie/Programs/BIO/MixedModeFracture.htm>

Des changements défavorables dans le réseau de collagène se produisent avec l'âge et de tels changements peuvent conduire à la diminution de la résistance mécanique de l'os (Wang, Shen, Li, & Agrawal, 2002). Un taux de remodelage osseux élevé est associé à une diminution de la minéralisation ce qui a pour conséquence de réduire la rigidité de l'os et peut être associé à une modification du contenu des réticulations du collagène. Selon les travaux de Mansell and Bailey (2003), non seulement la quantité de collagène est importante pour la solidité des os, mais aussi la vitesse à laquelle il se renouvelle. Lors de l'ostéoporose, la qualité du collagène osseux est modifiée. Une plus grande proportion de liaisons transversales immatures et une augmentation d'hydroxylsines sont observées lors de l'ostéoporose. Ce sont des traits caractéristiques de la fragilité osseuse.

Les modifications post-traductionnelles (lysylhydroxylation, glycosylation et la formation de réticulations) du collagène de type I semblent jouer un rôle important dans le maintien de l'intégrité structurelle du réseau de collagène osseux et dans la préservation des os (Tzaphlidou, 2005). Des changements dans ces modifications post-traductionnelles sont associés à des changements dans les propriétés mécaniques de l'os (Tzaphlidou, 2005). Ainsi, l'augmentation des

liaisons transversales du collagène (pyridinoline et déoxypyridinoline) est associée à une augmentation de la rigidité osseuse (Viguet-Carrin et al., 2006).

Deux types de processus non enzymatique sont décrits dans le collagène de type I: la formation de produits de glycation (ou AGE) en raison de l'accumulation des sucres réductibles dans le tissu osseux, et le processus de racémisation et d'isomérisation dans les télépeptides du collagène. Ces modifications du collagène sont liées à l'âge et peuvent altérer les propriétés mécaniques de l'os.

Le collagène est la protéine majeure constitutive du tissu osseux. Quel est l'importance de son apport via l'alimentation ?

2. LE COLLAGÈNE EXOGENE ALIMENTAIRE

La gélatine et le collagène hydrolysé (HC) sont des polypeptides produits par une hydrolyse standardisée du collagène provenant de la peau et des os d'animaux. Ces dérivés du collagène ont longtemps été utilisés dans les produits pharmaceutiques et les aliments aux États-Unis et en Europe. Ces polypeptides traversent la barrière intestinale sous forme de di- ou tripeptides pouvant être utiles pour des processus de biosynthèse protéique (Aito-Inoue, Lackeyram, Fan, Sato, & Mine, 2007; Iwai et al., 2005; Oesser, Adam, Babel, & Seifert, 1999; Ohara, Matsumoto, Ito, Iwai, & Sato, 2007; Sugihara, Inoue, Kuwamori, & Taniguchi, 2012).

La première description de l'effet bénéfique de l'ingestion de gélatine fut rapportée pour la première fois par Ste Hildegard Von Bingen dans son livre *Physica*: « Si quelqu'un souffre d'une douleur lancinante dans ses membres et ses articulations, il devrait faire cuire les pieds d'un bœuf et d'en manger en quantité suffisante » (Von Bingen, 1158). En raison de ses propriétés nutritionnelles et constitutives de la matrice ostéo-cartilagineuse, l'effet du collagène hydrolysé a été largement étudié ces dernières décennies et il a été proposé que l'hydrolysate de collagène pourrait être un agent thérapeutique intéressant pour la gestion des troubles articulaires (Bruyère et al., 2012; Fujita et al., 2002; Henrotin et al., 2011; Trc & Bohmova, 2011).

Compte tenu du rôle important du collagène dans la matrice osseuse, la consommation d'aliments riches en collagène pourrait être bénéfique pour la santé osseuse. L'effet du HC sur le métabolisme osseux a été évalué pour la première fois en 1996 chez des femmes ostéoporotiques. Les résultats ont démontré qu'une ingestion de 10g par jour de HC en complément d'un traitement à la calcitonine améliore l'effet inhibiteur de la calcitonine sur les marqueurs de la résorption osseuse par rapport à la calcitonine seule. Par la suite, certaines études ont suggéré qu'une alimentation enrichie en collagène hydrolysé pourrait améliorer le métabolisme osseux et la DMO.

Ce chapitre a fait l'objet d'une revue intitulée "Biological effect of hydrolyzed collagen on bone metabolism" parue dans le journal *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* (**article 1**).

Cette revue détaille tout d'abord la digestibilité et l'absorption intestinale du collagène hydrolysé pour s'intéresser ensuite à son effet sur le métabolisme osseux à travers des études cliniques, *in vivo* ou encore *in vitro*. Enfin, la revue décrypte quels peuvent être les mécanismes d'action potentiel du HC sur les cellules osseuses.



OBJECTIFS DE THESE

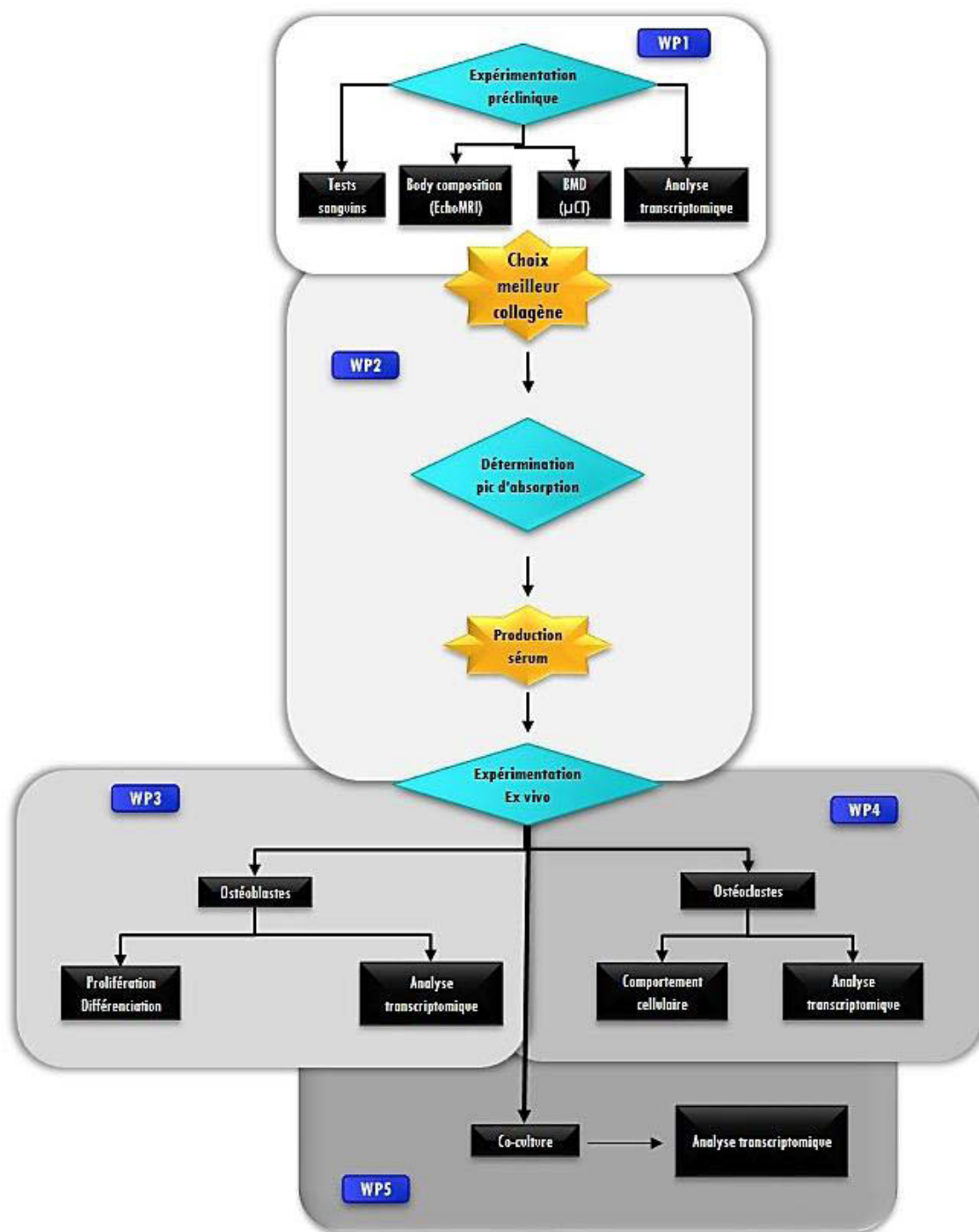


Figure 29: Représentation schématique de notre démarche scientifique

Les thématiques de nutrition-santé ont pris une place de plus en plus importante dans le paysage scientifique et médical. A l'échelle du squelette, la prévention nutritionnelle des pathologies ostéoarticulaires s'articule autour de différents micro ou macronutriments dont les protéines ; et dans ce cadre, l'étude de l'effet du collagène hydrolysé sur le tissu osseux s'est montrée prometteuse. Récemment, plusieurs études *in vivo* ont permis de démontrer que l'ingestion de collagène hydrolysé améliore l'acquisition de masse osseuse lors de la croissance (Leem et al., 2013; Takeda, Park, Kawashima, Ezawa, & Omi, 2013; Xu, Han, & Li, 2010). Ces perspectives s'appliquent également sur les phases de vieillissement. Sur des modèles d'ovariectomie de rongeurs (souris et rats), l'ingestion de collagène hydrolysé permet de limiter la perte de masse osseuse (Daneault, Coxam, Fabien Soulé, & Wittrant, 2014; Guillerminet et al., 2010; Han et al., 2009).

La plupart des études portant sur l'effet du HC sur le métabolisme osseux sont restées descriptives. Notre ambition fut d'emmener le sujet plus loin.

Ainsi, le premier objectif de cette thèse a été d'établir une cartographie la plus exhaustive possible des éléments de la littérature dont nous disposions afin de nous appuyer sur les études publiées et de déterminer les lignes directrices de cette étude pour qu'elles soient des plus pertinentes et originales possible. La revue intitulée « Biological effect of hydrolyzed collagen on bone metabolism » et présentée ci-après propose une vue d'ensemble de la littérature parue sur ce sujet (**article 1**). A l'issue de ce travail nous avons défini différents axes de recherche portant sur la forme, le poids moléculaire et la source de collagène hydrolysé présentant un effet maximal.

Le deuxième objectif de notre étude a donc été d'évaluer l'impact des hydrolysats de collagène de différentes sources (poisson, porc et bœuf) et différents poids moléculaires (2 et 5kDa) sur la viabilité et l'activité de pré-ostéoblastes murins (lignée MC3T3-E1) puis d'en caractériser l'influence *in vivo* sur des souris C3H/HeN afin de définir le meilleur couple poids moléculaire/origine.

Dans les études *in vitro*, le collagène hydrolysé a souvent été utilisé « pur » sur les cellules osseuses, sans prendre en compte sa digestion ni l'influence du métabolisme général. Il est important de noter que seul Tsuruoka et ses collaborateurs (Tsuruoka, Yamato, Sakai, Yoshitake, & Yonekura, 2007), ont étudié son effet sous une forme tripeptide (forme plus physiologique). **Ainsi, notre troisième objectif a été de d'essayer de nous rapprocher d'un contexte plus physiologique afin de pouvoir étudier les mécanismes d'action des « véritables » métabolites du collagène.** Nous avons alors utilisé une méthode originale d'enrichissement de sérum à partir des mêmes souris C3H/HeN. Ces sera ont ensuite été incubés avec différents types de culture de cellules osseuses afin d'obtenir des résultats « physiologiquement plus adéquats ».

Afin de répondre au mieux à nos objectifs, les travaux de cette thèse se sont articulés autour de 5 workpackages présentés en Figure 29. Celle-ci permet de visualiser les relations entre les différents workpackages et objectifs. Les résultats des objectifs 2 et 3 sont regroupés dans l'**article 2** intitulé Bovine Hydrolyzed Collagen Promotes Bone Health

In Ovariectomized Mice Through Modulation Of Osteoblast And Osteoclast Coupling (Daneault et al.) et soumis au Journal of Functional Food.



| RESULTATS

Article 1



BIOLOGICAL EFFECT OF HYDROLYZED COLLAGEN ON BONE METABOLISM

Audrey Daneault, Janne Prawitt, Véronique Fabien Soulé, Véronique Coxam and Yohann Wittrant

Article accepté au journal *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*

L'ostéoporose est une maladie chronique et asymptomatique caractérisée par une masse osseuse faible et une détérioration de la microarchitecture osseuse, augmentant le risque de fracture. Les comorbidités associées sont plus fréquentes chez les personnes âgées. En raison d'une population de plus en plus vieillissante, l'ostéoporose est devenue un problème majeur de santé nécessitant une gestion innovante de la maladie. Les protéines sont importantes pour les os car elles leur fournissent des éléments essentiels à sa construction et exercent une fonction régulatrice spécifique. Voilà pourquoi un apport suffisant en protéines joue un rôle considérable à la fois, lors du développement osseux et dans la préservation de la masse osseuse. Plus précisément, puisque une augmentation du métabolisme du collagène peut conduire à des dysfonctionnements graves et une matrice osseuse plus fragile et parce que le collagène administré par voie orale peut être digéré dans l'intestin, traverser la barrière intestinale, entrer dans la circulation et devenir disponible pour les processus métaboliques dans les tissus cibles, on peut spéculer que d'un régime enrichi en collagène fournit des bénéfices pour le squelette. Les coproduits du collagène, tels que la gélatine ou le collagène hydrolysé (HC) sont bien reconnus pour leur innocuité d'un point de vue nutritionnel, mais quel est leur impact sur la biologie osseuse? Dans ce manuscrit, nous passerons en revue des données probantes de la littérature sur l'effet du HC sur les tissus osseux en vue de déterminer si le HC peut représenter une alternative pertinente à la conception de futures approches nutritionnelles afin de gérer la prévention de l'ostéoporose.

BIOLOGICAL EFFECT OF HYDROLYZED COLLAGEN ON BONE METABOLISM

Critical Reviews in Food Science and Nutrition

Audrey Daneault^{1,2,3}, Janne Prawitt⁴, Véronique Fabien Soulé³, Yohann Wittrant^{1,2*} and
Véronique Coxam^{1,2}

1. INRA, UMR 1019, UNH, CRNH Auvergne, F-63009 CLERMONT-FERRAND, FRANCE

2. Clermont Université, Université d'Auvergne, Unité de Nutrition Humaine, BP 10448, F-63000 CLERMONT-FERRAND, FRANCE

3. Rousselot SAS, 4 rue de l'abreuvoir, 92400 COURBEVOIE, FRANCE

4. Rousselot BVBA, Meulestedekaai 81, 9000 GENT, BELGIUM

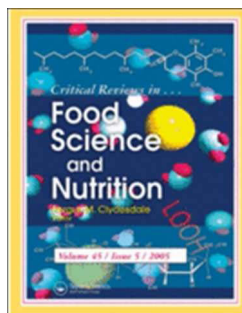
*Corresponding author: yohann.wittrant@clermont.inra.fr

Conflict of Interest

Audrey Daneault, Yohann Wittrant and Veronique Coxam have no conflicts of interest.

Acknowledgements

The authors thank Dr. Janne Prawitt and Véronique Fabien-Soulé from Rousselot for their contribution to our ongoing project.



BIOLOGICAL EFFECT OF HYDROLYZED COLLAGEN ON BONE METABOLISM

Journal:	<i>Critical Reviews in Food Science and Nutrition</i>
Manuscript ID:	BFSN-2015-1585.R1
Manuscript Type:	Review
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Daneault, Audrey; INRA, Coxam, Véronique; INRA, Wittrant, Yohann; INRA, Centre de Recherche Clermont-Ferrand/Theix
Keywords:	Osteoporosis, Collagen, Hydrolyzed collagen, Bone

SCHOLARONE™
Manuscripts

**BIOLOGICAL EFFECT OF HYDROLYZED COLLAGEN ON BONE
METABOLISM**

Abstract

Osteoporosis is a chronic and asymptomatic disease characterized by low bone mass and skeletal microarchitectural deterioration, increased risk of fracture and associated co-morbidities most prevalent in the elderly. Due to an increasingly aging population, osteoporosis has become a major health issue requiring innovative disease management. Proteins are important for bone by providing building blocks and by exerting specific regulatory function. This is why adequate protein intake plays a considerable role in both bone development and bone maintenance. More specifically, since an increase in the overall metabolism of collagen can lead to severe dysfunctions and a more fragile bone matrix and because orally administered collagen can be digested in the gut, cross the intestinal barrier, enter the circulation and become available for metabolic processes in the target tissues, one may speculate that a collagen-enriched diet provides benefits for the skeleton. Collagen-derived products such as gelatin or hydrolyzed collagen (HC) are well acknowledged for their safety from a nutritional point of view, however what is their impact on bone biology? In this manuscript, we critically review the evidence from literature for an effect of HC on bone tissues in order to determine whether HC may represent a relevant alternative in the design of future nutritional approaches to manage osteoporosis prevention.

Abbreviation: Hydrolyzed Collagen (HC)

Keywords: Collagen · Hydrolyzed collagen · Bone · Osteoporosis

1. A need for alternative osteoporosis treatments

Osteoporosis is considered as a major cause of morbidity, disability and as an important contributor to medical care costs in many regions of the world. Its prevalence increases with age and the disease is twice more common in women than in men because of the hormonal changes that occur during menopause (Kanis, 1994). It has been defined as a skeletal disorder characterized by a low bone mineral density and micro-architectural alterations of bone tissue predisposing to an increased risk of fracture (1993; NIH, 2000). Several drugs are available for the treatment of osteoporosis such as bisphosphonates or parathyroid hormone derivatives. However, it has been highlighted that compliance to such therapy is usually poor and that the benefit does not continue after the end of treatment. This is why there is an increasing rationale to focus on early prevention to avoid or delay limitations of skeletal functions, rather than to curative strategies. However, classical prophylaxis with hormone replacement therapy is restricted due to concerns about an increased risk for cancer and cardiovascular disease. This is why health professionals strongly advocate the implementation of new strategies with proven scientific and clinical value for the prevention of osteoporosis (Coxam, Davicco, & Demigne, 2008). In this light, food has multiple assets for good compliance. Over the past 30 years research in nutrition has led to an exciting progress supporting the hypothesis that dietary intervention, including dietary supplements, can modulate specific target functions in the body and thus reduce the risk of disease. In this line dietary intervention may offer an effective means to deal with the problem of osteoporosis and its consequential health costs. A nutritional approach has been shown to be a cost-effective way of reducing calcium and vitamin D insufficiency, and thereby improving bone health and reducing fracture risk (Lotters et al., 2013). The primary goal of a nutritional strategy for the prevention of bone loss is to provide a sufficiently bioavailable amount of constitutive elements such as calcium, proteins as well as nutrients endowed with specific bone sparing properties (proteins, some fatty acids, micronutrients...) (Coxam et al., 2008; Nieves, 2013). Based on this concept and because proteins play a major role in bone by providing building blocks and by exerting specific regulatory functions collagen may provide a new option for aging consumers to maintain good health. Nevertheless, the scientists need to provide a high level of proof based on clinical trials, preclinical investigations and mechanistic studies to establish a health claim.

2. Collagen and bone biology

2.1. *Collagen structure is associated with bone mechanical properties*

Collagen comprises of three polypeptide strands (alpha-chains) which form a unique triple-helical structure (Fig. 1). To wind into a triple helix, the chains must contain glycine as every third residue thus presenting the repeating structure Gly-X-Y (Exposito, Valcourt, Cluzel, & Lethias, 2010), in which X and Y are mainly proline (Pro) and hydroxyproline (Hyp) (Gelse, 2003). The resulting Gly-Pro-Hyp triplet is the most frequent (10.5%) (Ramshaw, Shah, & Brodsky, 1998). In addition, the amino-acids Lys, Gln and Arg show a periodic distribution of 18 residues (Ottani, Martini, Franchi, Ruggeri, & Raspanti, 2002; Ramshaw et al., 1998). Collagens represent 30% of the total protein mass in the body (Ricard-Blum, 2011) and are therefore the most abundant proteins in mammals. They are the major structural element in the extracellular matrix of all connective tissues, including bone where they represent about 80% of the total protein (Tzaphlidou, 2005). While the mineral content mainly determines bone stiffness and rigidity, collagens provide skeletal toughness. Basically, they form the scaffold for the attachment of cells and the anchorage of macromolecules, defining the shape of the tissue. Collagen fibers in bone are organized in concentric layers providing maximal resistance against torsional and compressive stress (Bailey, 2001). Within the fibers, the collagen molecules are precisely aligned in a quarter-staggered end-overlap manner. This arrangement provides holes within the fiber for the nucleation of calcium apatite crystals.

As a matter of fact, the term “collagen” comprises a large and still growing family of proteins. They all share the same feature: a right-handed triple helix composed of alpha-chains assembled into a rope-like figure bordered by the C- and N-propeptides (Shoulders & Raines, 2009) (Fig. 1). However, if the average collagen molecule measures 300 nm in length (corresponding to about 1000 amino acids) and 1.5 nm in diameter, the length of the triple helical part varies considerably between the different collagen types (Exposito et al., 2010; Ottani et al., 2002). Collagen types, their distribution and composition are listed in Table 1S (supplemental data). In bone approximately 95% is type I collagen (a heterotrimer formed by two identical $\alpha 1(I)$ - chains and one $\alpha 2(I)$ -chain) providing viscoelastic strength, torsional stiffness, and load bearing capacity while also presenting nucleation sites for crystalline deposition. Type II collagen is also involved in bone formation, even though it is mainly found in cartilage (Álvarez et al., 2000; Aszódi, Chan, Hunziker, Bateman, & Fässler, 1998). Types III, V (Kahai, Vary, Gao, & Seth, 2004), VI (Keene, Sakai, & Burgeson, 1991), and X (Rosati et al., 1994) are present in bone at a very low level. Unlike type I, collagen type III fibrils are less ordered, thinner, and always combined with other collagen types. Association of types III and VI are characteristic for some regions of mature bone (for example rat proximal femur) (Luther, Saino, Carter, & Aaron, 2003). The function of type V collagen

is not well defined (Niyibizi & Eyre, 1994). Type VI is a microfibrillar collagen which seems to line the matrix surrounding the osteocytes and their canaliculi (Keene et al., 1991). Finally, according to Hjorten *et al.*, type XXVII collagen is found during cartilage calcification and the transition of cartilage into bone during osteogenesis as well as in cartilage modeling during endochondral bone formation (Hjorten et al., 2007).

2.2. Collagen network alterations lead to bone fragility

In bone, collagen plays an important role in the force transmission and tissue structure maintenance. Importantly, it determines the amount of mineral deposition. Thus the capacity of bone to resist mechanical forces and fractures depends not only on the quantity of bone tissue (mineralization) but also on its quality (organization of the collagen framework) (Currey, 2003; Viguet-Carrin, Garnero, & Delmas, 2006).

During aging, changes in the collagen network reduce bone mechanical strength and elasticity, which contributes to the occurrence of osteoporotic fractures (Wang, Shen, Li, & Agrawal, 2002). In postmenopausal osteoporosis there is growing evidence that at the material level, the volume fraction of mineral and the relative amounts of mature and immature collagen crosslinks are affected by the tissue turnover rate, thus contributing to bone fragility (Viguet-Carrin et al., 2006). Indeed, estrogen deficiency has been shown to affect collagen stability by decreasing its maturation rate (Sanada et al., 1978). Luther *et al.* observed a disconnection of the collagen fibers after ovariectomy (Luther et al., 2003). In the same line, Kafantari's group reported structural changes in fibril architecture as well as diameter due to altered crosslinks and hydroxylation in the ovariectomized rat (Kafantari, Kounadi, Fatouros, Milonakis, & Tzaphlidou, 2000). Moreover, in inflammation-mediated osteoporosis, severe alterations were detected at the ultrastructural level in bone and skin collagen fibrils in rabbits (Fountos, Kounadi, Tzaphlidou, Yasumura, & Glaros, 1998).

Regarding the mechanisms involved in ageing, Knott *et al.* highlighted an increase in the overall metabolism of collagen which may account for impaired post-translational modifications, leading to severe dysfunctions in the collagen network and a more fragile bone matrix (Knott & Bailey, 1998). Altered post-translational modifications hamper the formation of cross-links between collagen molecules based on aldehyde formation from specific telopeptide hydroxylysine or lysine residues (Knott & Bailey, 1998) and include an abnormal increase in lysyl hydroxylation or glycosylation, which are key to sustain the structural and mechanical integrity of the collagen network (M. Saito & Marumo, 2010; Yeowell & Pinnell, 1993). These alterations lead to thinner fibrils and higher bone fragility. Another age-related non-enzymatic modification of collagen is the formation of advanced glycation end products (AGE) via the so-called Maillard reaction, due to the

accumulation of reducible sugars in bone tissue (Viguet-Carrin et al., 2006). In addition, racemization (spontaneous conversion of the L-enantiomeric form to the biologically rare D-form) and isomerization (transfer of the peptide backbone from the aspartyl residue alpha-carboxyl group to the side chain beta- or gamma-carboxyl group) occur during aging, resulting in structurally altered forms of the collagen molecule with disrupted function (Viguet-Carrin et al., 2006).

The knowledge of certain genetic diseases further emphasizes the importance of correctly formed collagen. The replacement of just one glycine residue by another amino acid can lead to pathologies such as osteogenesis imperfecta and the Ehlers-Danlos Syndrome which are characterized by bone fragility, weak tendons and thin skin (Gautieri, Buehler, & Redaelli, 2009). Subtypes of the Ehlers-Danlos Syndrome are linked to mutations in type I or type III collagens, lysyl hydroxylase, or procollagen N-proteinase (Yeowell & Pinnell, 1993). Type VI collagen deficiency results in a disorganized collagen arrangement suggesting that collagen type VI contributes to maintain bone mass (Izu et al., 2012). Mutations in COL1A1 coding for the $\alpha 1(I)$ -chain) and COL1A2 (coding for the $\alpha 2(I)$ -chain) are linked to osteogenesis imperfecta, a group of brittle bone diseases. Further, a polymorphism in the Sp1 binding site of the COL1A1 gene results in the synthesis of altered collagen with a possible association to both decreased bone strength and bone mineral density and has thus been postulated to play a role in osteoporosis (Mann et al., 2001). In summary, mutations in genes that encode individual chains of triple-helical bone collagens as well as in genes encoding proteins involved in the intracellular and extracellular modifications of the molecule are associated with heritable diseases of the skeletal tissues and the development of skeletal abnormalities (Arnold & Fertala, 2013). These data emphasize the major role of collagen quantity and quality in bone remodeling.

3. Collagen in nutrition and food supplements

Collagen-derived ingredients (gelatin and HC) are widely used in food, cosmetic and pharmaceutical industries or tissue engineering thanks to their gelling capacity (gel formation, texturizing, thickening and water binding capacities) as well as their surface (emulsion, foam formation and stabilization, adhesion and cohesion, protective colloid function and film forming capacity) and hydration properties (swelling and solubility). The terms “hydrolyzed gelatin”, “collagen hydrolysate”, “hydrolyzed collagen” or sometimes “collagen peptides” used in publications designate the same product. Gelatin is obtained by a partial thermal hydrolysis of collagen which (partially) separates the chains by destroying the crosslinks (Fig. 2). Subsequently, gelatin is extracted,

purified and dried (Karim & Bhat, 2009). Two types of gelatin with different characteristics can be manufactured. Type A gelatin is produced from acid-treated collagen, while alkali-treatment forms type B gelatin. The extraction process (temperature, time, and pH) can influence the length of the polypeptide chains and the functional properties of the gelatin. This is why the quality of a gelatin preparation depends on the manufacturing method, but also from which species or tissue it is extracted (Gómez-Guillén, Giménez, López-Caballero, & Montero, 2011). For instance, shark gelatin has different characteristics than pig gelatin (Yoshimura et al., 2000).

To form HC, gelatin is submitted to an enzymatic hydrolysis, the most commonly used proteases being trypsin, chymotrypsin, pepsin, alcalase, properase E, pronase, collagenase, bromelain and papain (Gómez-Guillén et al., 2011). HC is usually presented as a white powder with good solubilisation properties, commonly used as a dietary supplement or included in various foodstuffs. Like for gelatin, HC molecular weight distribution, structure and composition, and subsequently functional properties, depend on the processing conditions as well as the raw material and the specificity of the enzyme used to hydrolyze the gelatin (Denis et al., 2008). The average molecular weight of HC ranges between 2,000 and 6,000 Daltons (Moskowitz, 2000). The most abundant sources of gelatin or HC are derived from mammals such as pig skin (46%), bovine hide (29.4%) and pork and cattle bones (23.1%) (Gómez-Guillén et al., 2011). However, the demand for alternative sources has increased after the bovine spongiform encephalopathy (BSE) crisis and for religious and cultural reasons (Karim & Bhat, 2008; Mhd Sarbon, Badii, & Howell, 2013). Production from non-mammalian species, for instance from fish, is thus of growing importance (Mhd Sarbon et al., 2013; Nagai & Suzuki, 2000; Singh, Benjakul, Maqsood, & Kishimura, 2011; Zeng et al., 2012).

3.1. Safety

Gelatin, and by extension HC, have been approved as Generally Recognized As Safe (GRAS) by the US Food and Drug Administration (USFDA) Center for Food Safety and Nutrition. Indeed, there is no documented evidence of a deleterious effect from the ingestion of HC other than a rare allergy, sensation of unpleasant taste or feeling of heaviness in the stomach. In a multicenter, randomized, parallel, placebo-controlled clinical trial, of 389 patients who were orally treated with 10g HC or placebo over a period of 6 months, only 12 dropped out due to side effects and among those 9 had received the placebo (Moskowitz, 2000). Comparably, in a multicenter, randomized, parallel, double-blind study carried out on one hundred male and female volunteers aged ≥ 40 years with knee osteoarthritis, HC was well tolerated (Trc & Bohmova, 2011). Recorded adverse events were similar

whether the volunteers were given 10g HC daily or glucosamine sulphate for 90 consecutive days (Trc & Bohmova, 2011). HC tolerability has also been assessed in various animal studies. Acute, subacute, mutagenic and teratogenic toxicity analyses have not indicated any health risk. Indeed, Takeda *et al.* studied the acute and subacute toxicity of collagen from bovine derm, showing no marked deleterious effect except for local irritation which was seen only after parenteral administration (U. Takeda et al., 1982). In the same line, Wu *et al.* described the high safety of oral HC administration in a rat model when given 1660 mg/kg body weight per day (corresponding to about 10 times the currently used doses in humans). Notwithstanding, rats could exhibit kidney hypertrophy at a dose of 100 times the recommended daily intake (166 mg/kg body weight per day) (Wu, Fujioka, Sugimoto, Mu, & Ishimi, 2004). Schauss *et al.* also conducted two acute and subchronic oral toxicity investigations in rats with hydrolyzed chicken sternal cartilage which contains mostly type II collagen (Schauss, Merkel, Glaza, & Sorenson, 2007). With a single dose of 5000 mg/kg, all the animals survived without any major pathological lesions, exhibiting a normal body weight gain throughout the study. Regarding subchronic toxicity, all the animals survived and showed no significant changes in body weight or histopathology, whether they were administered 0, 30, 300 or 1000 mg/day of the test product per kg of body weight for over 90 days. Additionally, the risk for chronic toxic effects was not higher in marine HC-treated rats at concentrations of 2.25%, 4.5%, 9% and 18% (wt/wt) in the diet (equivalent to 1063, 2216, 4609 and 8586 mg/kg·body weight/day for females, and 0907, 1798, 3418, 6658 mg/kg·bw/day for males, respectively), than in those fed the basal rodent diet (Liang et al., 2012). Note however that cardiac arrhythmias have been observed in 3 of 6 subjects receiving 300 kcal/ day as HC (equivalent to 75 g/day, ie all the protein intake in the form of collagen) supplemented with triptophane, calcium, magnesium, phosphorus, potassium, vitamins (Lantigua, Amatruda, Biddle, Forbes, & Lockwood, 1980). Deaths have even been registered in obese adults who were reducing their body weight by means of diets that provided same amounts of collagen or gelatin hydrolysates (300 to 500 kcal/day) without any supplementation in micronutrients (Van Itallie & Yang, 1984).

3.2. Bioavailability

Orally administered HC are digested in the gut, cross the intestinal barrier, enter the circulation and become available for metabolic processes in the target tissues. Even though HC does not contain all the essential amino acids (tryptophan is not present, and cysteine only in small amounts), it is often used to supplement other proteins because of its high digestibility, good consumer tolerance and its specific amino-acid content (high Hyp, Pro and Gly) (Iwai et al., 2005; Ohara, Matsumoto, Ito, Iwai, & Sato, 2007). As a matter of fact, ingestion of a

protein hydrolysate, as opposed to its intact form, accelerates the digestion and the absorption from the gut, increases postprandial amino acid bioavailability and tends to improve the incorporation rate of dietary amino acids into target tissues (Koopman et al., 2009). This concept was confirmed by Urao *et al.* who found that intestinal permeability followed a different pattern for small molecular weight particles than for large molecules in rabbits, suggesting there may be different mechanisms of intestinal transport for molecules of different size (Urao, Okuyama, Drongowski, Teitelbaum, & Coran, 1997). It has been proposed that HC peptides are only digested to a certain degree within the gastrointestinal tract, with a proportion of intact high-molecular-weight proteins reaching the blood by passing through the enterocyte (transcytosis) at a level of approximately 10% (Moskowitz, 2000) (Fig. 3). Oesser *et al.* demonstrated that 95% of orally applied HC were resorbed within 6 hours from the gastro-intestinal tract of mice (Oesser, Adam, Babel, & Seifert, 1999). Just one hour after oral administration already 47% had been absorbed. Iwai *et al.* provided evidence in humans, that oral ingestion of HC significantly increased the peptide form of Hyp in blood with a maximum level after 1-2 hours and a decrease to half of the maximum level after 4 hours (Iwai et al., 2005).

Subsequent to oral ingestion of HC in rodents and humans, various studies have shown that HC-derived amino acids, as well as di- and tripeptides can be detected in blood as well as in various target tissues such as cartilage (Oesser et al., 1999), skin (Kawaguchi, Nanbu, & Kurokawa, 2012) or kidney (Watanabe-Kamiyama et al., 2010). The major collagen-derived dipeptide found in plasma is Pro-Hyp (Ichikawa et al., 2010; Iwai et al., 2005; Shigemura et al., 2011). It is highly resistant to hydrolysis and is not digestible by peptidase (Aito-Inoue, Lackeyram, Fan, Sato, & Mine, 2007) like other Hyp-containing peptides (Ohara et al., 2007). In addition, small amounts of other di- and tripeptides such as Ala-Hyp, Ala-Hyp-Gly, Leu-Hyp, Ile-Hyp, Phe-Hyp, Pro-Hyp-Gly, (Iwai et al., 2005) and Gly-Pro-Hyp can be detected (Ichikawa et al., 2010; Watanabe-Kamiyama et al., 2010). Another peptide, Hyp-Gly, was more recently discovered in human plasma upon collagen ingestion (Shigemura et al., 2011; Sugihara, Inoue, Kuwamori, & Taniguchi, 2012). It is noticeable that the average plasma concentration of those peptides is dose-dependent: Hyp-containing peptides reach maximum levels of 6.43, 20.17 and 32.84 nmol/mL following ingestion of 30.8, 153.8 and 384.6 mg doses of HC, respectively (Shigemura et al., 2011; Shigemura, Kubomura, Sato, & Sato, 2014). Moreover, the quantity and structure of such Hyp-containing peptides in human blood after oral administration of HC depends on the source; for example, Ala-Hyp-Gly and Ser-Hyp-Gly were detected only from fish scale gelatin hydrolysate, Ala-Hyp and Pro-Hyp-Gly from fish scale or fish skin gelatin hydrolysates, whereas Leu-Hyp, Ile-Hyp and Phe-Hyp appeared after ingestion of fish and to a lower level porcine skin originated HC (Ohara et al., 2007). Finally, synergistic

effects with the food matrix can occur and improve HC absorption, for instance when HC is provided within fermented milk (Walrand, Chiotelli, Noirt, Mwewa, & Lassel, 2008).

3.3. *Hydrolyzed collagen reaches the bone tissue*

To synthesize a single picogram of collagen type II, more than 1 billion glycine molecules and 620 million proline molecules are required. In the absence of these amino acids, the anabolic phase of collagen metabolism can be impaired (Clark, 2007). Proline and Hydroxyproline serves to stabilize the collagen triple helix, their structure constrain the rotation of the polypeptide collagen chain and creates and strengthens the helical characteristics of the molecule. Proline biosynthesis is related to both the citric acid cycle and the urea cycle. In looking at other proline biosynthetic pathways, the arginine / ornithine / glutamic semialdehyde / proline pathway looks the most promising (Barbul, 2008). As a matter of fact, orally consumed HC has not only been shown to be well absorbed in the intestine, but also to accumulate in target tissues. *Kawaguchi et al.* studied the biodistribution of orally administered [¹⁴C]Pro-Hyp in rats using autoradiography (Kawaguchi et al., 2012). They observed a wide distribution of radioactivity at 30 min post-dose and a cellular uptake of radioactivity in osteoblasts and osteoclasts as well as in dermal fibroblasts, epidermal cells, synovial cells and chondrocytes after 24 h. In addition, according to Watanabe's group, absorption of low molecular weight HC in the ovariectomized rat was associated with an increased content of the organic substance in bone (Watanabe-Kamiyama et al., 2010). Finally, Barbul has shown that during the early phases of wound healing, wound fluid proline levels are at least 50% higher than plasma levels, suggesting active import of proline into the wound (Barbul, 2008).

4. **Hydrolyzed collagen affects bone biology**

4.1. *Evidence from animal models*

Growth models: young growing rats are potential models to study factors that can influence bone mass accrual and thereby affect peak bone mass (table 1). In growing male rats, HC supplementation has been described to promote the development of long bones (Xu, Han, & Li, 2010). The reported increase in size, dry weight, ash weight, bone mineral density and both stiffness and toughness of femurs was likely related to an increased osteoblast activity rather than a decreased rate of bone resorption, since higher serum osteocalcin and bone-specific alkaline phosphatase (BALP) content was observed with no significant difference in N-terminal telopeptide of type I collagen (NTX). *Leem et al.* confirmed a dose-dependent effect of a selected HC with a

molecular weight of <3 kDa on longitudinal bone growth and height of the growth plate in adolescent male rats, whereas gelatin as such failed to produce the same effect (Leem, Lee, Jang, & Kim, 2013). Insulin like growth factor -1 (IGF1) and bone morphogenetic protein-2 were highly expressed in the growth plate in the treated group animals. Accordingly, Takeda *et al.* demonstrated that moderate HC consumption (20% protein in the diet of which 30% was HC) increased bone mass during growth in rats and that running exercise further promoted the effect. No further beneficial effect on bone mass was elicited with a higher HC intake (40% protein in the diet of which 30% was HC) (S. Takeda, Park, Kawashima, Ezawa, & Omi, 2013). Finally, in the work published by Wu *et al.* (Wu *et al.*, 2004), carried out in growing male rat, collagen peptides given at amounts equal to the currently used doses in humans (166 mg/kg body weight per day) or at a 10 or even a 100 higher dose (1660 or 16660 mg/kg body weight per day), bone mineral density of the femur was significantly higher in the animals given the highest dose.

Bone loss models: Most of the studies set up to study the effect of HC on bone loss have been carried out in young OVX animals (table 1). Although, the only small animal model recommended by the FDA (Thompson, Simmons, Pirie, & Ke, 1995) for preclinical evaluation of postmenopausal bone loss is the aged OVX rat model because in marked contrast to postmenopausal women, growing rodents have very little, if any, bone remodeling (Erben, 1996), young growing rats can provide useful information on the short-term effects of drugs on bone resorption, calcium kinetics and balance, or calciotropic hormone levels. They can also be used to evaluate the effects of interventions aimed at increasing osteoblastic recruitment and bone formation (Bonjour, Ammann, & Rizzoli, 1999). As a matter of fact, ovariectomized (OVX) rodents are currently used as animal models to study postmenopausal osteoporosis. Estrogen deficiency results in disorganized bone collagen fibrils of smaller diameter in both trabecular and cortical bone (Garcia-Moreno *et al.*, 1995). In inflammation-mediated osteoporosis (similar to senile osteoporosis), severe alterations at the ultrastructural level in bone and skin collagen fibrils were detected in rabbits (Fountos *et al.*, 1998). A growing body of evidence demonstrates the potential of collagen intake to prevent bone loss in models of estrogen deficiency.

Nomura *et al.* demonstrated the efficacy of shark skin gelatin to increase type I collagen and glycosaminoglycan content as well as bone mineral density in the femur of OVX rats to a level comparable in the sham operated group (Nomura, Oohashi, Watanabe, & Kasugai, 2005). In the same line, Han and colleagues tested cod gelatin for 90 days in 3-month old female Sprague-Dawley OVX rats observing a preserved femoral neck bone mineral density and trabecular microarchitectural properties in OVX rats fed a gelatin compared to a control diet (2009).

The beneficial effect was partly attributed to a significant reduction of pro-inflammatory cytokines (IL-1beta, IL-6 and TNF-alpha) and a decreased urinary excretion of resorption markers (NTX, C telopeptides of type I collagen (CTX) and deoxypyridinoline). As mentioned above, HC ingestion can increase the content of organic substance in bone (Watanabe-Kamiyama et al., 2010). In OVX rats, HC supplementation at a level 10 times higher than the human recommendations (i.e. 10g/day) unequivocally contributed to the conservation of vertebral mass, protein content (including osteocalcin) and mechanical strength, not seen when gelatin was used as a supplement (De Almeida Jackix, Cuneo, Amaya-Farfan, de Assuncao, & Quintaes, 2010). In the same experimental model, Kim *et al.* observed a prevention of trabecular bone loss and improved microarchitecture of the lumbar vertebrae (H. K. Kim, Kim, & Leem, 2013). Finally, Guillerminet *et al.* demonstrated that HC administration to 3- month old OVX C3H/HeN mice increased bone mineral density and bone strength (Guillerminet et al., 2010). The fact that plasma concentrations of CTX were lower while BALP levels were higher under HC treatment suggested that collagen can improve bone remodeling. These data allow to test for evidence of heterogeneity of bone turnover in such a condition of bone loss, and to attempt to devise an 'uncoupling index' by using the relationship between bone-specific biochemical markers of bone formation and bone resorption. Indeed, where turnover markers are reported, bone formation and degradation markers should always be reported in tandem (Eastell et al., 1993). In the present case, increased bALP levels, while CTX decreased may indicate a net benefit to bone.

That is, it cannot be determined whether bone formation increased to a greater degree than resorption, suggesting a net benefit to bone, or to a lesser degree, suggesting net harm to bone, or to a similar degree, suggesting bone turnover remains tightly coupled.

A second study by the same group showed that the HC administration for 3 or 6 months significantly prevented bone loss in OVX mice (Guillerminet et al., 2012). The authors further demonstrated that HC ingestion for 3 months is as efficient as raloxifene to protect 3-month-old OVX mice from bone loss. Such a bone sparing effect was also seen as soon as 1 month post-surgery in a follow-up study (Daneault, Coxam, Fabien Soulé, & Wittrant, 2014). Finally, in a mice model of protein undernutrition, have shown that gelatin has differential effects on bone mineral density compared to casein (6% casein + 4% gelatin having a greater effect than a 10% casein diet) (Koyama et al., 2001).

Bone healing models: Tsuruoka *et al.* have shown that oral administration of HC to rats with femur damage accelerated the fracture healing (Tsuruoka, Yamato, Sakai, Yoshitake, & Yonekura, 2007) (table 1).

Accordingly, a 3-week oral supplementation with High Advanced-Collagen Tripeptide (HACP), a soluble powder containing about 20% of Gly-X-Y was beneficial for the bone healing process after a cortical bone defect in rats (Hata et al., 2008).

Altogether these results from preclinical models provide a solid body of evidence that HC has a promising potential to maintain a balanced bone turnover in different physiological settings (growth, bone loss, healing) by promoting bone formation (the ratio of bone formation to resorption biomarkers being used to represent the state of bone turnover). In those studies, the significant difference in such a ratio denotes an improvement in bone turnover in favor of bone formation resulting from HC supplementation. Consequently, like postulated by Elam et al. (Elam et al., 2014), HC may serve as an effective supplement for preventing bone loss by significantly enhancing the organic substance content of bone. This could be explained by a downregulation of the production of pro-inflammatory molecules such as interleukins- 1b and - 6, and tumor necrosis factor- α . Because these cytokines in particular are responsible for upregulation of receptor activator for nuclear factor kappa-B ligand (RANKL) for osteoclast recruitment, this may explain the noteworthy impairment of bone loss

The key emerging question is whether these results can be extrapolated to the human situation.

4.2. Evidence from clinical trials

If HC has already been used as a food supplement to sooth pain in patients suffering from osteoarthritis, to date very few clinical studies have evaluated its effects on bone metabolism (Bagchi et al., 2002; Bruyere, Zegels, et al., 2012; Fujita, Ohue, Fujii, Miyauchi, & Takagi, 2002; Henrotin, Lambert, Couchourel, Ripoll, & Chiotelli, 2011; Moskowitz, 2000; Trc & Bohmova, 2011) (table 2). In most of the studies, HC is applied in association with other compounds like drugs or food supplements (Elam et al., 2014; Hooshmand et al., 2013).

In a first clinical investigation, the effects of calcitonin alone or in combination with a HC-rich diet were studied on bone metabolism in postmenopausal women. The results revealed that a daily ingestion of 10g HC associated with intra-muscular injection of calcitonin (100 UI) twice a week for 24 weeks enhanced and prolonged the effect of the drug as shown by a fall in urinary pyridinoline cross-link levels (Adam, Spacek, Hulejova, Galianova, & Blahos, 1996). Next, Fujita *et al.* evaluated the effect of a daily supplementation with 900 mg absorbable algal calcium, 3.5 g collagen and other matrix components, including glucosamine (Fujita et al., 2002). Urinary excretion of NTX was decreased in the supplemented group. In addition to the calcium-mediated suppression of parathyroid hormone, collagen degradation was reduced by the inhibition of cytokine-

induced metalloproteinase release, including collagenase. Consistently, another study reported, that in osteopenic post-menopausal women consumption of 5 g calcium/collagen mix (containing 500 mg of calcium carbonate and 5 µg vitamin D) for 3 months enhanced bone mass by orienting bone turnover towards formation rather than resorption (increased BALP/TRAP5b ratio), compared to control volunteers (given 500 mg of calcium carbonate and 5 µg vitamin D daily) (Hooshmand et al., 2013). However, in another investigation the daily ingestion of only HC (10 g/d) for 24 weeks in osteopenic post-menopausal women did not produce any significant effect on bone metabolism as assessed by resorption or formation biomarkers such as osteocalcin and BALP (Cuneo, Costa-Paiva, Pinto-Neto, Morais, & Amaya-Farfan, 2010). The authors noticed that the majority of patients exhibited an excess body weight (it is thus possible that they did not receive a sufficient dose) as well as inadequate calcium intake, which could have been limiting for the HC effect. More recently, Elam et al (2014) reported that long-term calcium collagen chelate supplementation together with vitamin D, may provide protection against excessive bone loss and turnover (for which calcium and vitamin D alone could not prevent), in postmenopausal women (Elam et al., 2014).

Finally, since the bone mass at a given age also depends on the peak bone mass acquired during growth, investigating the effect of HC in children is of interest. Martin-Bautista *et al.* demonstrated in a 4-months randomized double-blind study, that a daily intake of HC (with or without calcium) at key stages of growth and development had a beneficial effect on bone remodeling (Martin-Bautista et al., 2011). The bone formation factors Insulin-like growth factor 1 (IGF1) and BALP were higher in the group receiving HC when compared to the placebo group.

Although the existing data on HC effects on bone health in humans is promising, the Group for the Respect of Ethics and Excellence in Science has comprehensively outlined (Bruyere, Rizzoli, et al., 2012), that further, well designed studies are warranted to strengthen the scientific evidence, also with regard to the pathways that mediate HC effects on bone health.

4.3. Mechanisms involved in collagen effects on bone

Changes in bone cell behavior: Studies investigating the *in vitro* effect of hydrolyzed collagen provide interesting data even though we must stay aware of the limitations of such approaches (table 3). As a matter of fact, in the body, the bone cells are never exposed to collagen as usually used in these studies. Indeed, digestion of dietary collagen in the gastro intestinal tract is followed by first-pass metabolism during absorption, and bioactive molecules (i.e., proteins, peptides...) will appear in the circulation (Fig. 4). Therefore testing the effect

of serum from animals fed specific enriched diets on cellular outcomes should provide better information for evaluation of dietary effect on specific organ. It should be noted that only Tsuruoka et al. (Tsuruoka et al., 2007) considered a physiological form (collagen tripeptide).

Most of the studies investigating the effect of HC on bone cell metabolism have focused on bone forming cells (osteoblasts) (Fig. 5). In 1998, Komori *et al.* reported that bone marrow stromal cells differentiate into osteoblasts when cultured with type I collagen matrix (Komori & Kishimoto, 1998). Andrianarivo and collaborators demonstrated concurrent biochemical changes in the human cell line MG-63 in response to type I collagen exposure involving increased specific activity of cell-associated alkaline phosphatase and increased secretion of osteonectin (up to 2.5-fold for each protein) (1992). Using osteoblasts derived from rat calvaria and grown on collagen type I films, Lynch *et al.* defined the critical role of type I collagen in mediating the signaling cascade for the expression of a mature osteoblast phenotype and the mineralization of the extracellular matrix in a physiological manner (Lynch, Stein, Stein, & Lian, 1995). They described the temporal expression of genes characterizing distinct periods of growth and differentiation. During the initial proliferation period, expression of fibronectin, beta 1 integrin, and actin was decreased by 50 to 70% in cells grown on collagen. In contrast, alkaline phosphatase enzyme activity was elevated during the proliferation period, while mRNA levels remained low, suggesting a post-transcriptional regulation. In the postproliferative period, osteonectin, osteocalcin, and osteopontin were up-regulated. These results strongly support that collagen I from bone extracellular matrix may play an important role in osteoblastic differentiation and phenotypic expression.

Regarding HC, Fu *et al.* observed that salmon skin gelatin hydrolysates were capable to induce cell proliferation, accelerated cell cycle progression and to inhibit cell apoptosis in human hFOB1.19 cells, especially when skin HC were hydrolyzed with papain compared to other proteases (Fu & Zhao, 2013). Kim *et al.* confirmed the dose-dependent effect of HC on human osteoblast proliferation (H. K. Kim et al., 2013; H. K. Kim, Kim, & Leem, 2014a) and recent data from our lab have provided evidence of both enhanced osteoblast differentiation and proliferation as well as improved cell survival and viability by bovine HC (Daneault et al., 2014). In parallel, Liu *et al.* demonstrated that bovine HC promotes osteoblast differentiation and mineralized bone matrix formation (Liu et al., 2014). Accordingly, HC dose-dependently stimulates type I collagen mRNA expression and protein production (H. K. Kim et al., 2014a; Tsuruoka et al., 2007; Yamada, Yoshizawa, et al., 2013) as well as alkaline phosphatase activity (Guillerminet et al., 2010; H. K. Kim et al., 2013; Yamada, Nagaoka, et al., 2013). Incubation of human osteoblasts with 0.1% fish HC increased osteocalcin, osteopontin, BMP-2 and integrin $\beta 3$ mRNA expression and accelerated matrix mineralization as compared to untreated cells (Yamada, Yoshizawa, et

al., 2013). Consequently, this translated into increased calcium disposal or mineralization in either human or murine osteoblasts (Liu et al., 2014; Tsuruoka et al., 2007; Yamada, Nagaoka, et al., 2013; Yamada, Yoshizawa, et al., 2013) (Fig. 5). In addition to an effect on osteoblasts, the impact of HC on osteoclast biology was investigated. A significant inhibition of osteoclast formation and activity in cell lines and in primary cultures was observed when incubated with bovine and porcine HC (Guillerminet et al., 2010) or with shark protein hydrolysates (Uehara, Takahashi, Watanabe, & Nomura, 2014). Consistently, we recently found a higher OPG/RANKL ratio after incubation of MC3T3 cells with bovine HC reflecting an unfavorable metabolic orientation for osteoclast differentiation (Daneault et al., 2014). Similar to HC, in human osteoblastic MG-63 cells, other peptides such as egg yolk-derived peptides have been shown to stimulate early stages of the osteogenic differentiation via the MAPK/ELK1 signaling pathway (up-regulation of genes responsible for bone formation such as *ALPL*, *COL1A1*, and *SPPI*) and accelerate mineralization by hastening mineralization initiation, subsequently leading to an increase in the extent of calcium deposition (H. K. Kim, Kim, & Leem, 2014b).

Molecular mechanisms: Interaction of the Asp-Gly-Glu-Ala amino acid domain of type I collagen with the $\alpha 2\beta 1$ integrin receptor on the cell membrane was proven to be an important signal for bone marrow cell differentiation towards an osteoblastic phenotype (Mizuno & Kuboki, 2001). Additionally, HC-induction of the bone-specific transcription factor osterix was associated with the up-regulation of type I collagen expression, thus providing insights into the molecular basis of HC action on osteoblasts (H. K. Kim et al., 2014a; Tsuruoka et al., 2007; Yamada, Yoshizawa, et al., 2013). Bovine HC was shown to stimulate osteoblast differentiation, mineralized bone matrix formation, ALP activity, and osteocalcin production through increased Runx2 expression and activity (Liu et al., 2014). Activation of ERK1/2, JNK1/2, p38, and ELK1 phosphorylation in the human osteoblast cell line MG-63 by HC was correlated with increased COL1A1, alkaline phosphatase, osteocalcin and osteopontin gene expression (H. K. Kim et al., 2014a). Extracellular signal-regulated kinase (ERK) inhibitor abolished the HC-induced COL1A1 expression, thus supporting the importance of the ERK/MAPK signaling pathway in mediating HC effects on osteoblast cells (H. K. Kim et al., 2013). Furthermore, it cannot be excluded that, due to its richness in aromatic amino-acids (HYP), hydrolyzed collagen can induce IGF1 production which consequently activate a calcium sensing receptor and in turn exert an anabolic effect on bone as previously shown (Conigrave, Brown, & Rizzoli, 2008; Dawson-Hughes, Harris, Rasmussen, & Dallal, 2007). Finally, HC appears to greatly impact osteoblast biology but the mechanisms

underlying their action are only partially understood. Besides, the impact of HC on osteoclasts remains to be further investigated.

Other effects of hydrolyzed collagen: In addition to a direct modulation of bone cells, HC has been shown to improve calcium absorption, another very important mechanism for preserving bone capital (G. H. Kim et al., 1998). Indeed, epidemiological, isotopic and meta-analysis studies suggest that dietary protein works synergistically with calcium to improve calcium retention and bone metabolism (Kerstetter, Kenny, & Insogna, 2011). For example, brush border membrane vesicle Ca uptake studies suggest that higher protein intake improves Ca absorption, at least in part, by increasing transcellular Ca uptake (Gaffney-Stomberg et al., 2010). Jung *et al.* isolated fish-bone peptides with a high affinity to calcium and a high content of phosphopeptide (Jung, Lee, & Kim, 2006). Using ovariectomized rats, they observed a higher calcium retention and a preservation of both bone mineral density and bone strength when rodents were supplemented with those peptides. HC from both fish and shrimp were described to contain both, a biologically related calcitonin and/or calcitonin-gene-related peptide (Fouchereau-Peron et al., 1999). Nevertheless this observation requires further investigation with regards to the role of these peptide fragments in bone biology. Besides, HC derived from chicken bones has been shown to reduce proinflammatory-cytokine production in mice (Zhang et al., 2010) and recent works support natural antioxidative properties of HC peptides (Alemán, Giménez, Pérez-Santin, Gómez-Guillén, & Montero, 2011; Ao & Li, 2012). In addition, as bone tissue function is closely linked to lipid metabolism, it is worth noting that the Pro-Hyp peptide reduces the size of lipid droplets in mouse 3T3-L1 preadipocytes (Minaguchi et al., 2012) and that fish HC was found to affect lipid absorption and metabolism in rats resulting in a lower transient increase of plasma triglycerides and associated inflammation (Masataka Saito, Kiyose, Higuchi, Uchida, & Suzuki, 2009). Finally, it cannot be excluded that immunomodulation can be involved. *In vitro* and *in vivo* studies have shown that certain peptide fractions in fish protein hydrolysates may stimulate the nonspecific immune defense system (Khora, 2013). Indeed, according to Gómez-Guillén et al. collagen and gelatin-derived peptides have numerous bioactivities, among which antimicrobial activity, mineral binding capacity, a lipid-lowering effect, immunomodulatory activity and beneficial effects on skin, bone or joint health (Gómez-Guillén et al., 2011).

5. Conclusion

A growing body of evidence demonstrates that HC owns bioactive properties beneficial for bone tissue, including stimulation of bone forming cells, improvement of calcium absorption, anti-inflammatory and antioxidant capacities. Those properties render HC a new and innovative candidate for putative dietary intervention in the prevention of osteoporosis. Still, many questions remain to be answered: what is the optimal form of HC, what is the optimal dose? To date, we recently started to address these questions and identified that origin and length of hydrolyzed collagen may play an important role in mediating positive action on bone (unpublished data). In parallel, investigations of the signaling pathways involved in the bone sparing effect are now required to further support these conclusions. Altogether, in the light of the increasing prevalence of osteoporosis related to the worldwide increasing longevity, good candidates for dietary prevention are of particular relevance. As such, HC could offer additional values to calcium and vitamin D, thus responding to the growing demand for primary prevention.

6. References

Adam, M., Spacek, P., Hulejova, H., Galianova, A., & Blahos, J. (1996). [Postmenopausal osteoporosis. Treatment with calcitonin and a diet rich in collagen proteins]. *Cas Lek Cesk*, 135(3), 74-78.

Aito-Inoue, M., Lackeyram, D., Fan, M. Z., Sato, K., & Mine, Y. (2007). Transport of a tripeptide, Gly-Pro-Hyp, across the porcine intestinal brush-border membrane. *J Pept Sci*, 13(7), 468-474. doi: 10.1002/psc.870

Alemán, A., Giménez, B., Pérez-Santin, E., Gómez-Guillén, M., & Montero, P. (2011). Contribution of Leu and Hyp residues to antioxidant and ACE-inhibitory activities of peptide sequences isolated from squid gelatin hydrolysate. *Food Chemistry*, 125(2), 334-341.

Álvarez, J., Balbín, M., Santos, F., Fernández, M., Ferrando, S., & López, J. M. (2000). Different bone growth rates are associated with changes in the expression pattern of types II and X collagens and collagenase 3 in proximal growth plates of the rat tibia. *Journal of Bone and Mineral Research*, 15(1), 82-94.

Andrianarivo, A. G., Robinson, J. A., Mann, K. G., & Tracy, R. P. (1992). Growth on type I collagen promotes expression of the osteoblastic phenotype in human osteosarcoma MG-63 cells. *J Cell Physiol*, 153(2), 256-265.

Ao, J., & Li, B. (2012). Amino acid composition and antioxidant activities of hydrolysates and peptide fractions from porcine collagen. *Food Science and Technology International*, 18(5), 425-434.

Arnold, W. V., & Fertala, A. (2013). Skeletal diseases caused by mutations that affect collagen structure and function. *Int J Biochem Cell Biol*, 45(8), 1556-1567.

- Aszódi, A., Chan, D., Hunziker, E., Bateman, J. F., & Fässler, R. (1998). Collagen II is essential for the removal of the notochord and the formation of intervertebral discs. *J Cell Biol*, 143(5), 1399-1412.
- Bagchi, D., Misner, B., Bagchi, M., Kothari, S. C., Downs, B. W., Fafard, R. D., & Preuss, H. G. (2002). Effects of orally administered undenatured type II collagen against arthritic inflammatory diseases: a mechanistic exploration. *Int J Clin Pharmacol Res*, 22(3-4), 101-110.
- Bailey, A. J. (2001). Molecular mechanisms of ageing in connective tissues. *Mechanisms of ageing and development*, 122(7), 735-755.
- Barbul, A. (2008). Proline precursors to sustain Mammalian collagen synthesis. *J Nutr*, 138(10), 2021S-2024S.
- Bonjour, J. P., Ammann, P., & Rizzoli, R. (1999). Importance of preclinical studies in the development of drugs for treatment of osteoporosis: a review related to the 1998 WHO guidelines. *Osteoporos Int*, 9(5), 379-393. doi: 10.1007/s001980050161
- Bruyere, O., Rizzoli, R., Coxam, V., Avouac, B., Chevalier, T., Fabien-Soule, V., . . . Reginster, J. Y. (2012). Assessment of health claims in the field of bone: a view of the Group for the Respect of Ethics and Excellence in Science (GREES). *Osteoporos Int*, 23(1), 193-199. doi: 10.1007/s00198-011-1561-x
- Bruyere, O., Zegels, B., Leonori, L., Rabenda, V., Janssen, A., Bourges, C., & Reginster, J. Y. (2012). Effect of collagen hydrolysate in articular pain: a 6-month randomized, double-blind, placebo controlled study. *Complement Ther Med*, 20(3), 124-130. doi: 10.1016/j.ctim.2011.12.007
- Clark, K. L. (2007). Nutritional considerations in joint health. *Clin Sports Med*, 26(1), 101-118. doi: 10.1016/j.csm.2006.11.006
- Conference, C. D. (1993). Diagnosis, prophylaxis, and treatment of osteoporosis. *Am J Med*, 94(6), 646-650.
- Conigrave, A. D., Brown, E. M., & Rizzoli, R. (2008). Dietary protein and bone health: roles of amino acid-sensing receptors in the control of calcium metabolism and bone homeostasis. *Annu Rev Nutr*, 28, 131-155. doi: 10.1146/annurev.nutr.28.061807.155328
- Coxam, V., Davicco, M. J., & Demigne, C. (2008). Nutrition et métabolisme osseux. In Lavoisier (Ed.), *Aliments fonctionnels* (pp. 729-798).
- Cuneo, F., Costa-Paiva, L., Pinto-Neto, A. M., Morais, S. S., & Amaya-Farfan, J. (2010). Effect of dietary supplementation with collagen hydrolysates on bone metabolism of postmenopausal women with low mineral density. *Maturitas*, 65(3), 253-257. doi: 10.1016/j.maturitas.2009.10.002
- Currey, J. D. (2003). Role of collagen and other organics in the mechanical properties of bone. *Osteoporos Int*, 14 Suppl 5, S29-36. doi: 10.1007/s00198-003-1470-8

Daneault, A., Coxam, V., Fabien Soulé, V., & Wittrant, Y. (2014). Hydrolyzed collagen contributes to osteoblast differentiation in vitro and subsequent bone health in vivo. Paper presented at the OARSI World Congress, Paris, France.

Dawson-Hughes, B., Harris, S. S., Rasmussen, H. M., & Dallal, G. E. (2007). Comparative effects of oral aromatic and branched-chain amino acids on urine calcium excretion in humans. *Osteoporos Int*, 18(7), 955-961. doi: 10.1007/s00198-006-0320-x

De Almeida Jackix, E., Cuneo, F., Amaya-Farfan, J., de Assuncao, J. V., & Quintaes, K. D. (2010). A food supplement of hydrolyzed collagen improves compositional and biodynamic characteristics of vertebrae in ovariectomized rats. *J Med Food*, 13(6), 1385-1390. doi: 10.1089/jmf.2009.0256

Denis, A., Brambati, N., Dessauvages, B., Guedj, S., Ridoux, C., Meffre, N., & Autier, C. (2008). Molecular weight determination of hydrolyzed collagens. *Food Hydrocolloids*, 22(6), 989-994.

Eastell, R., Robins, S. P., Colwell, T., Assiri, A. M., Riggs, B. L., & Russell, R. G. (1993). Evaluation of bone turnover in type I osteoporosis using biochemical markers specific for both bone formation and bone resorption. *Osteoporos Int*, 3(5), 255-260.

Elam, M. L., Johnson, S. A., Hooshmand, S., Feresin, R. G., Payton, M. E., Gu, J., & Arjmandi, B. H. (2014). A Calcium-Collagen Chelate Dietary Supplement Attenuates Bone Loss in Postmenopausal Women with Osteopenia: A Randomized Controlled Trial. *J Med Food*. doi: 10.1089/jmf.2014.0100

Erben, R. G. (1996). Trabecular and endocortical bone surfaces in the rat: modeling or remodeling? *Anat Rec*, 246(1), 39-46. doi: 10.1002/(SICI)1097-0185(199609)246:1<39::AID-AR5>3.0.CO;2-A

Exposito, J. Y., Valcourt, U., Cluzel, C., & Lethias, C. (2010). The fibrillar collagen family. *Int J Mol Sci*, 11(2), 407-426. doi: 10.3390/ijms11020407

Fouchereau-Peron, M., Duvail, L., Michel, C., Gildberg, A., Batista, I., & Le Gal, Y. (1999). Isolation of an acid fraction from a fish protein hydrolysate with a calcitonin-gene-related-peptide-like biological activity. *Biotechnol Appl Biochem*, 29(1), 87-92.

Fountos, G., Kounadi, E., Tzaphlidou, M., Yasumura, S., & Glaros, D. (1998). The effects of inflammation-mediated osteoporosis (IMO) on the skeletal Ca/P ratio and on the structure of rabbit bone and skin collagen. *Applied radiation and isotopes*, 49(5), 657-659.

Fu, Y., & Zhao, X.-H. (2013). In vitro responses of hFOB1.19 cells towards chum salmon (*Oncorhynchus keta*) skin gelatin hydrolysates in cell proliferation, cycle progression and apoptosis. *Journal of Functional Foods*, 5(1), 279-288. doi: 10.1016/j.jff.2012.10.017

- Fujita, T., Ohue, M., Fujii, Y., Miyauchi, A., & Takagi, Y. (2002). The effect of active absorbable algal calcium (AAA Ca) with collagen and other matrix components on back and joint pain and skin impedance. *J Bone Miner Metab*, 20(5), 298-302. doi: 10.1007/s007740200043
- Gaffney-Stomberg, E., Sun, B. H., Cucchi, C. E., Simpson, C. A., Gundberg, C., Kerstetter, J. E., & Insogna, K. L. (2010). The effect of dietary protein on intestinal calcium absorption in rats. *Endocrinology*, 151(3), 1071-1078. doi: 10.1210/en.2009-0744
- Garcia-Moreno, C., Calvo, O. M., Herrero, S., Martin, E., Suquia, B., San Roman, J. I., . . . del Pino, J. (1995). Heterogeneous decrease of bone mineral density in the vertebral column of ovariectomized rats. *Bone*, 16(4 Suppl), 295S-300S.
- Gautieri, A., Buehler, M. J., & Redaelli, A. (2009). Deformation rate controls elasticity and unfolding pathway of single tropocollagen molecules. *J Mech Behav Biomed Mater*, 2(2), 130-137. doi: 10.1016/j.jmbbm.2008.03.001
- Gelse, K. (2003). Collagens—structure, function, and biosynthesis. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 55(12), 1531-1546. doi: 10.1016/j.addr.2003.08.002
- Gómez-Guillén, M. C., Giménez, B., López-Caballero, M. E., & Montero, M. P. (2011). Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review. *Food Hydrocolloids*, 25(8), 1813-1827. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.02.007>
- Guillerminet, F., Beaupied, H., Fabien-Soule, V., Tome, D., Benhamou, C. L., Roux, C., & Blais, A. (2010). Hydrolyzed collagen improves bone metabolism and biomechanical parameters in ovariectomized mice: an in vitro and in vivo study. *Bone*, 46(3), 827-834. doi: 10.1016/j.bone.2009.10.035
- Guillerminet, F., Fabien-Soule, V., Even, P. C., Tome, D., Benhamou, C. L., Roux, C., & Blais, A. (2012). Hydrolyzed collagen improves bone status and prevents bone loss in ovariectomized C3H/HeN mice. *Osteoporos Int*, 23(7), 1909-1919. doi: 10.1007/s00198-011-1788-6
- Han, X., Xu, Y., Wang, J., Pei, X., Yang, R., Li, N., & Li, Y. (2009). Effects of cod bone gelatin on bone metabolism and bone microarchitecture in ovariectomized rats. *Bone*, 44(5), 942-947. doi: 10.1016/j.bone.2008.12.005
- Hata, S., Hayakawa, T., Okada, H., Hayashi, K., Akimoto, Y., & Yamamoto, H. (2008). Effect of Oral Administration of High Advanced-Collagen Tripeptide (HACP) on Bone Healing Process in Rat. *Journal of hard tissue biology*, 17(1), 17-21.

Henrotin, Y., Lambert, C., Couchourel, D., Ripoll, C., & Chiotelli, E. (2011). Nutraceuticals: do they represent a new era in the management of osteoarthritis? - a narrative review from the lessons taken with five products. *Osteoarthritis Cartilage*, 19(1), 1-21. doi: 10.1016/j.joca.2010.10.017

Hjorten, R., Hansen, U., Underwood, R. A., Telfer, H. E., Fernandes, R. J., Krakow, D., . . . Pace, J. M. (2007). Type XXVII collagen at the transition of cartilage to bone during skeletogenesis. *Bone*, 41(4), 535-542. doi: 10.1016/j.bone.2007.06.024

Hooshmand, S., Elam, M. L., Browne, J., Campbell, S. C., Payton, M. E., Gu, J., & Arjmandi, B. H. (2013). Evidence for bone reversal properties of a calcium-collagen chelate, a novel dietary supplement. *Journal of Food & Nutritional Disorders*, 2, 1. doi: doi:10.4172/2324-9323.1000102

Ichikawa, S., Morifuji, M., Ohara, H., Matsumoto, H., Takeuchi, Y., & Sato, K. (2010). Hydroxyproline-containing dipeptides and tripeptides quantified at high concentration in human blood after oral administration of gelatin hydrolysate. *Int J Food Sci Nutr*, 61(1), 52-60. doi: 10.3109/09637480903257711

Iwai, K., Hasegawa, T., Taguchi, Y., Morimatsu, F., Sato, K., Nakamura, Y., . . . Ohtsuki, K. (2005). Identification of food-derived collagen peptides in human blood after oral ingestion of gelatin hydrolysates. *J Agric Food Chem*, 53(16), 6531-6536. doi: 10.1021/jf050206p

Izu, Y., Ezura, Y., Mizoguchi, F., Kawamata, A., Nakamoto, T., Nakashima, K., . . . Noda, M. (2012). Type VI collagen deficiency induces osteopenia with distortion of osteoblastic cell morphology. *Tissue Cell*, 44(1), 1-6. doi: 10.1016/j.tice.2011.08.002

Jung, W.-K., Lee, B.-J., & Kim, S.-K. (2006). Fish-bone peptide increases calcium solubility and bioavailability in ovariectomised rats. *British Journal of Nutrition*, 95(01), 124-128.

Kafantari, H., Kounadi, E., Fatouros, M., Milonakis, M., & Tzaphlidou, M. (2000). Structural alterations in rat skin and bone collagen fibrils induced by ovariectomy. *Bone*, 26(4), 349-353. doi: 10.1016/s8756-3282(99)00279-3

Kahai, S., Vary, C. P., Gao, Y., & Seth, A. (2004). Collagen, type V, alpha1 (COL5A1) is regulated by TGF-beta in osteoblasts. *Matrix Biol*, 23(7), 445-455. doi: 10.1016/j.matbio.2004.09.004

Kanis, J. A. (1994). Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis: synopsis of a WHO report. WHO Study Group. *Osteoporos Int*, 4(6), 368-381.

Karim, A., & Bhat, R. (2008). Gelatin alternatives for the food industry: recent developments, challenges and prospects. *Trends in food science & technology*, 19(12), 644-656.

- Karim, A., & Bhat, R. (2009). Fish gelatin: properties, challenges, and prospects as an alternative to mammalian gelatins. *Food Hydrocolloids*, 23(3), 563-576.
- Kawaguchi, T., Nanbu, P. N., & Kurokawa, M. (2012). Distribution of prolylhydroxyproline and its metabolites after oral administration in rats. *Biol Pharm Bull*, 35(3), 422-427.
- Keene, D. R., Sakai, L. Y., & Burgeson, R. E. (1991). Human bone contains type III collagen, type VI collagen, and fibrillin: type III collagen is present on specific fibers that may mediate attachment of tendons, ligaments, and periosteum to calcified bone cortex. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 39(1), 59-69. doi: 10.1177/39.1.1983874
- Kerstetter, J. E., Kenny, A. M., & Insogna, K. L. (2011). Dietary protein and skeletal health: a review of recent human research. *Curr Opin Lipidol*, 22(1), 16-20. doi: 10.1097/MOL.0b013e3283419441
- Khora, S. S. (2013). Marine fish-derived bioactive peptides and proteins for human therapeutics. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 5.
- Kim, G. H., Jeon, Y. J., Byun, H. G., Lee, Y. S., Lee, E. H., & Kim, S. K. (1998). Effect of calcium compounds from oyster shell bound fish skin gelatin peptide in calcium deficient rats. *Journal Of The Korean Fisheries Society*, 31 (2), 149-159.
- Kim, H. K., Kim, M. G., & Leem, K. H. (2013). Osteogenic activity of collagen peptide via ERK/MAPK pathway mediated boosting of collagen synthesis and its therapeutic efficacy in osteoporotic bone by back-scattered electron imaging and microarchitecture analysis. *Molecules*, 18(12), 15474-15489. doi: 10.3390/molecules181215474
- Kim, H. K., Kim, M. G., & Leem, K. H. (2014a). Collagen hydrolysates increased osteogenic gene expressions via a MAPK signaling pathway in MG-63 human osteoblasts. *Food Funct*, 5(3), 573-578. doi: 10.1039/c3fo60509d
- Kim, H. K., Kim, M. G., & Leem, K. H. (2014b). Effects of egg yolk-derived peptide on osteogenic gene expression and MAPK activation. *Molecules*, 19(9), 12909-12924. doi: 10.3390/molecules190912909
- Knott, L., & Bailey, A. J. (1998). Collagen cross-links in mineralizing tissues: a review of their chemistry, function, and clinical relevance. *Bone*, 22(3), 181-187.
- Komori, T., & Kishimoto, T. (1998). *Cbfa1* in bone development. *Current opinion in genetics & development*, 8(4), 494-499.

Koopman, R., Crombach, N., Gijzen, A. P., Walrand, S., Fauquant, J., Kies, A. K., . . . van Loon, L. J. (2009). Ingestion of a protein hydrolysate is accompanied by an accelerated in vivo digestion and absorption rate when compared with its intact protein. *Am J Clin Nutr*, 90(1), 106-115. doi: 10.3945/ajcn.2009.27474

Koyama, Y., Hirota, A., Mori, H., Takahara, H., Kuwaba, K., Kusubata, M., . . . Irie, S. (2001). Ingestion of gelatin has differential effect on bone mineral density and body weight in protein undernutrition. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*, 47(1), 84-86.

Lantigua, R. A., Amatruda, J. M., Biddle, T. L., Forbes, G. B., & Lockwood, D. H. (1980). Cardiac arrhythmias associated with a liquid protein diet for the treatment of obesity. *N Engl J Med*, 303(13), 735-738. doi: 10.1056/NEJM198009253031305

Leem, K. H., Lee, S., Jang, A., & Kim, H. K. (2013). Porcine skin gelatin hydrolysate promotes longitudinal bone growth in adolescent rats. *J Med Food*, 16(5), 447-453. doi: 10.1089/jmf.2012.2461

Liang, J., Pei, X. R., Zhang, Z. F., Wang, N., Wang, J. B., & Li, Y. (2012). A chronic oral toxicity study of marine collagen peptides preparation from chum salmon (*Oncorhynchus keta*) skin using Sprague-Dawley rat. *Mar Drugs*, 10(1), 20-34. doi: 10.3390/md10010020

Liu, J., Zhang, B., Song, S., Ma, M., Si, S., Wang, Y., . . . Guo, Y. (2014). Bovine collagen peptides compounds promote the proliferation and differentiation of MC3T3-E1 pre-osteoblasts. *PLoS One*, 9(6), e99920. doi: 10.1371/journal.pone.0099920

Lotters, F. J., Lenoir-Wijnkoop, I., Fardellone, P., Rizzoli, R., Rocher, E., & Poley, M. J. (2013). Dairy foods and osteoporosis: an example of assessing the health-economic impact of food products. *Osteoporos Int*, 24(1), 139-150. doi: 10.1007/s00198-012-1998-6

Luther, F., Saino, H., Carter, D. H., & Aaron, J. E. (2003). Evidence for an extensive collagen type III/VI proximal domain in the rat femur. *Bone*, 32(6), 652-659. doi: 10.1016/s8756-3282(03)00094-2

Lynch, M. P., Stein, J. L., Stein, G. S., & Lian, J. B. (1995). The influence of type I collagen on the development and maintenance of the osteoblast phenotype in primary and passaged rat calvarial osteoblasts: modification of expression of genes supporting cell growth, adhesion, and extracellular matrix mineralization. *Exp Cell Res*, 216(1), 35-45.

Mann, V., Hobson, E. E., Li, B., Stewart, T. L., Grant, S. F., Robins, S. P., . . . Ralston, S. H. (2001). A COL1A1 Sp1 binding site polymorphism predisposes to osteoporotic fracture by affecting bone density and quality. *J Clin Invest*, 107(7), 899-907.

- Martin-Bautista, E., Martin-Matillas, M., Martin-Lagos, J. A., Miranda-Leon, M. T., Munoz-Torres, M., Ruiz-Requena, E., . . . Campoy, C. (2011). A nutritional intervention study with hydrolyzed collagen in pre-pubertal spanish children: influence on bone modeling biomarkers. *J Pediatr Endocrinol Metab*, 24(3-4), 147-153.
- Mhd Sarbon, N., Badii, F., & Howell, N. K. (2013). Preparation and characterisation of chicken skin gelatin as an alternative to mammalian gelatin. *Food Hydrocolloids*, 30(1), 143-151.
- Minaguchi, J., Tometsuka, C., Koyama, Y.-i., Kusubata, M., Nagayasu, A., Sawaya, S., . . . Takehana, K. (2012). Effects of collagen-derived oligopeptide prolylhydroxyproline on differentiation of mouse 3T3-L1 preadipocytes. *Food Science and Technology Research*, 18(4), 593-599.
- Mizuno, M., & Kuboki, Y. (2001). Osteoblast-related gene expression of bone marrow cells during the osteoblastic differentiation induced by type I collagen. *J Biochem*, 129(1), 133-138.
- Moskowitz, R. W. (2000). Role of collagen hydrolysate in bone and joint disease. *Semin Arthritis Rheum*, 30(2), 87-99. doi: 10.1053/sarh.2000.9622
- Nagai, T., & Suzuki, N. (2000). Isolation of collagen from fish waste material—skin, bone and fins. *Food Chemistry*, 68(3), 277-281.
- Nieves, J. (2013). Skeletal effects of nutrients and nutraceuticals, beyond calcium and vitamin D. *Osteoporosis International*, 24(3), 771-786.
- NIH. (2000). Osteoporosis prevention, diagnosis, and therapy. *NIH Consens Statement*, 17(1), 1-45.
- Niyibizi, C., & Eyre, D. R. (1994). Structural characteristics of cross-linking sites in type V collagen of bone. Chain specificities and heterotypic links to type I collagen. *Eur J Biochem*, 224(3), 943-950.
- Nomura, Y., Oohashi, K., Watanabe, M., & Kasugai, S. (2005). Increase in bone mineral density through oral administration of shark gelatin to ovariectomized rats. *Nutrition*, 21(11-12), 1120-1126. doi: 10.1016/j.nut.2005.03.007
- Oesser, S., Adam, M., Babel, W., & Seifert, J. (1999). Oral administration of (14)C labeled gelatin hydrolysate leads to an accumulation of radioactivity in cartilage of mice (C57/BL). *J Nutr*, 129(10), 1891-1895.
- Ohara, H., Matsumoto, H., Ito, K., Iwai, K., & Sato, K. (2007). Comparison of quantity and structures of hydroxyproline-containing peptides in human blood after oral ingestion of gelatin hydrolysates from different sources. *J Agric Food Chem*, 55(4), 1532-1535. doi: 10.1021/jf062834s
- Ottani, V., Martini, D., Franchi, M., Ruggeri, A., & Raspanti, M. (2002). Hierarchical structures in fibrillar collagens. *Micron*, 33(7-8), 587-596.

Ramshaw, J. A., Shah, N. K., & Brodsky, B. (1998). Gly-X-Y tripeptide frequencies in collagen: a context for host-guest triple-helical peptides. *J Struct Biol*, 122(1-2), 86-91. doi: 10.1006/jsbi.1998.3977

Ricard-Blum, S. (2011). The collagen family. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 3(1), a004978. doi: 10.1101/cshperspect.a004978

Rosati, R., Horan, G. S., Pinero, G. J., Garofalo, S., Keene, D. R., Horton, W. A., . . . Behringer, R. R. (1994). Normal long bone growth and development in type X collagen-null mice. *Nat Genet*, 8(2), 129-135.

Saito, M., Kiyose, C., Higuchi, T., Uchida, N., & Suzuki, H. (2009). Effect of collagen hydrolysates from salmon and trout skins on the lipid profile in rats. *J Agric Food Chem*, 57(21), 10477-10482.

Saito, M., & Marumo, K. (2010). Collagen cross-links as a determinant of bone quality: a possible explanation for bone fragility in aging, osteoporosis, and diabetes mellitus. *Osteoporos Int*, 21(2), 195-214. doi: 10.1007/s00198-009-1066-z

Sanada, H., Shikata, J., Hamamoto, H., Ueba, Y., Yamamuro, T., & Takeda, T. (1978). Changes in collagen cross-linking and lysyl oxidase by estrogen. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 541(3), 408-413.

Schauss, A., Merkel, D., Glaza, S., & Sorenson, S. (2007). Acute and subchronic oral toxicity studies in rats of a hydrolyzed chicken sternal cartilage preparation. *Food and chemical toxicology*, 45(2), 315-321.

Shigemura, Y., Akaba, S., Kawashima, E., Park, E. Y., Nakamura, Y., & Sato, K. (2011). Identification of a novel food-derived collagen peptide, hydroxyprolyl-glycine, in human peripheral blood by pre-column derivatisation with phenyl isothiocyanate. *Food Chemistry*, 129(3), 1019-1024. doi: 10.1016/j.foodchem.2011.05.066

Shigemura, Y., Kubomura, D., Sato, Y., & Sato, K. (2014). Dose-dependent changes in the levels of free and peptide forms of hydroxyproline in human plasma after collagen hydrolysate ingestion. *Food Chemistry*, 159, 328-332.

Shoulders, M. D., & Raines, R. T. (2009). Collagen structure and stability. *Annu Rev Biochem*, 78, 929-958. doi: 10.1146/annurev.biochem.77.032207.120833

Singh, P., Benjakul, S., Maqsood, S., & Kishimura, H. (2011). Isolation and characterisation of collagen extracted from the skin of striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*). *Food Chemistry*, 124(1), 97-105.

- Sugihara, F., Inoue, N., Kuwamori, M., & Taniguchi, M. (2012). Quantification of hydroxyprolyl-glycine (Hyp-Gly) in human blood after ingestion of collagen hydrolysate. *J Biosci Bioeng*, 113(2), 202-203. doi: 10.1016/j.jbiosc.2011.09.024
- Takeda, S., Park, J. H., Kawashima, E., Ezawa, I., & Omi, N. (2013). Hydrolyzed collagen intake increases bone mass of growing rats trained with running exercise. *J Int Soc Sports Nutr*, 10(1), 35. doi: 10.1186/1550-2783-10-35
- Takeda, U., Odaki, M., Yokota, M., Sasaki, H., Niizato, T., Kawaoto, H., . . . Hayasaka, H. (1982). Acute and subacute toxicity studies on collagen wound dressing (CAS) in mice and rats. *The Journal of toxicological sciences*, 7, 63-91.
- Thompson, D. D., Simmons, H. A., Pirie, C. M., & Ke, H. Z. (1995). FDA Guidelines and animal models for osteoporosis. *Bone*, 17(4 Suppl), 125S-133S.
- Trc, T., & Bohmova, J. (2011). Efficacy and tolerance of enzymatic hydrolysed collagen (EHC) vs. glucosamine sulphate (GS) in the treatment of knee osteoarthritis (KOA). *Int Orthop*, 35(3), 341-348. doi: 10.1007/s00264-010-1010-z
- Tsuruoka, N., Yamato, R., Sakai, Y., Yoshitake, Y., & Yonekura, H. (2007). Promotion by Collagen Tripeptide of Type I Collagen Gene Expression in Human Osteoblastic Cells and Fracture Healing of Rat Femur. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 71(11), 2680-2687. doi: 10.1271/bbb.70287
- Tzaphlidou, M. (2005). The role of collagen in bone structure: an image processing approach. *Micron*, 36(7), 593-601.
- Uehara, K., Takahashi, A., Watanabe, M., & Nomura, Y. (2014). Shark protein improves bone mineral density in ovariectomized rats and inhibits osteoclast differentiation. *Nutrition*, 30(6), 719-725. doi: 10.1016/j.nut.2013.11.005
- Urao, M., Okuyama, H., Drongowski, R. A., Teitelbaum, D. H., & Coran, A. G. (1997). Intestinal permeability to small- and large-molecular-weight substances in the newborn rabbit. *J Pediatr Surg*, 32(10), 1424-1428.
- Van Itallie, T. B., & Yang, M. U. (1984). Cardiac dysfunction in obese dieters: a potentially lethal complication of rapid, massive weight loss. *Am J Clin Nutr*, 39(5), 695-702.
- Viguet-Carrin, S., Garnero, P., & Delmas, P. D. (2006). The role of collagen in bone strength. *Osteoporos Int*, 17(3), 319-336. doi: 10.1007/s00198-005-2035-9

Walrand, S., Chiotelli, E., Noirt, F., Mwewa, S., & Lassel, T. (2008). Consumption of a functional fermented milk containing collagen hydrolysate improves the concentration of collagen-specific amino acids in plasma. *J Agric Food Chem*, 56(17), 7790-7795. doi: 10.1021/jf800691f

Wang, X., Shen, X., Li, X., & Agrawal, C. M. (2002). Age-related changes in the collagen network and toughness of bone. *Bone*, 31(1), 1-7.

Watanabe-Kamiyama, M., Shimizu, M., Kamiyama, S., Taguchi, Y., Sone, H., Morimatsu, F., . . . Komai, M. (2010). Absorption and effectiveness of orally administered low molecular weight collagen hydrolysate in rats. *J Agric Food Chem*, 58(2), 835-841. doi: 10.1021/jf9031487

Wu, J., Fujioka, M., Sugimoto, K., Mu, G., & Ishimi, Y. (2004). Assessment of effectiveness of oral administration of collagen peptide on bone metabolism in growing and mature rats. *J Bone Miner Metab*, 22(6), 547-553. doi: 10.1007/s00774-004-0522-2

Xu, Y., Han, X., & Li, Y. (2010). Effect of marine collagen peptides on long bone development in growing rats. *J Sci Food Agric*, 90(9), 1485-1491. doi: 10.1002/jsfa.3972

Yamada, S., Nagaoka, H., Terajima, M., Tsuda, N., Hayashi, Y., & Yamauchi, M. (2013). Effects of fish collagen peptides on collagen post-translational modifications and mineralization in an osteoblastic cell culture system. *Dent Mater J*, 32(1), 88-95.

Yamada, S., Yoshizawa, Y., Kawakubo, A., Ikeda, T., Yanagiguchi, K., & Hayashi, Y. (2013). Early gene and protein expression associated with osteoblast differentiation in response to fish collagen peptides powder. *Dent Mater J*, 32(2), 233-240.

Yeowell, H. N., & Pinnell, S. R. (1993). The Ehlers-Danlos syndromes. *Semin Dermatol*, 12(3), 229-240.

Yoshimura, K., Terashima, M., Hozan, D., Ebato, T., Nomura, Y., Ishii, Y., & Shirai, K. (2000). Physical properties of shark gelatin compared with pig gelatin. *J Agric Food Chem*, 48(6), 2023-2027.

Zeng, S., Yin, J., Yang, S., Zhang, C., Yang, P., & Wu, W. (2012). Structure and characteristics of acid and pepsin-solubilized collagens from the skin of cobia (< i> Rachycentron canadum</i>). *Food Chemistry*, 135(3), 1975-1984.

Zhang, Y., Kouguchi, T., Shimizu, K., Sato, M., Takahata, Y., & Morimatsu, F. (2010). Chicken collagen hydrolysate reduces proinflammatory cytokine production in C57BL/6. KOR-ApoEshl mice. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*, 56(3), 208-210.

Figures' list:

Figure 1: The collagen triple helix

Figure 2: From collagen to gelatin and hydrolyzed collagen

Figure 3: Mechanisms of hydrolyzed collagen intestinal absorption

Figure 4: Integrated viewpoint of hydrolyzed collagen effects on bone remodeling process

Figure 5: Supposed cellular and molecular mechanisms of hydrolyzed collagen action on bone

Tables' list:

Table 1: *In vivo* studies on HC in bone biology

Table 2: Clinical studies on HC in bone biology

Table 3: *In vitro* studies on HC in bone biology

Table 1-S: Characteristics of the different collagen families

Table 1 : *In vivo* studies on HC in bone biology

	Model/ species	Number/ groups	Product	Origin	Dose	Duration of treatment	Effect of treatment	Ref
<i>In vivo</i> studies	Growth models	n= 24 male Wistar rats (5-week-old) 4 groups	Collagen peptide MW +/- 5 kDa	Porcine skin	166 mg/kg body weight /day (C1), 1600 mg/kg body weight /day (C10), and 16600 mg/kg body weight /day (C100)	4 weeks	BMD of the femur: C100 group > the other groups Kidneys hypertrophy in the C100 group	Wu et al. 2004
		n=80 Sprague–Dawley (3-week-old) 4 groups	Marine collagen peptides (MCP)	Chum salmon	1125, 2250 or 4500 mg/kg body weight	1 month	Bone size, mineral density,dry weight,ash weight: ↗	Xu et al. 2010
		n= 59 male Wistar rats (5-week-old) 5 groups	HC peptides MW: 1 kDa	Fish	20% casein group vs. 40% casein group vs. 20% HC group vs. 40% HC group	11 weeks	HC intake (20%): ↗ bone mass during growth and exercise period Higher HC intake has no more beneficial effect	Takeda et al. 2013
	Bone loss models	n= 32 SHRSP-Izumo rats (8-week-old) 3 groups: control (SHAM-operated) vs. OVX vs. OVX with HC	HC MW : 800 Da.	Chicken foot	10% HC in distilled water	20 weeks	↘ bone loss by increasing collagen bone content	Watanabe et al. 2010
		n = 60 femaleWistar rats (1-month-old) 4 groups	Gelatin	Shark skin	10, 20, or 40 mg/100 g of body weight per day	2 weeks	↗ BMD femur epiphysis in treated ovariectomized rats (> SHAM) ↗ contents of type I collagen and glycosaminoglycan in the epiphysis	Nomura et al. 2005
		n= 84 female Wistar rats (3-month-old) 7 groups: control (SHAM) vs OVX vs 5 groups OVX-HC	Gelatin	cod bone	0.375, 0.75, 1.5, 3, 6 mg/kg body weight	90 days	Prevention of BMD loss in proximal tibia and femoral neck at 3 g/kg. ↘ RANKL/OPG mRNA ratio at 3 g/kg and 6 g/kg	Han et al. 2009
		n= 48 female Wistar rats (3-month-old) 6 groups: OVX vs SHAM vs intact +/- gelatin vs. Hydrolysed collagen	HC	-	gelatin or HC equivalent from 1000 mg to 100g/day for a 60-kg person	8 weeks	↗ levels of protein and osteocalcin content (HC) preservation of vertebral mass, protein content, and mechanical strength (HC)	De Almeida et al. 2010
		n = 84 female Sprague Dawley rats SHAM vs. OVX: ovariectomized group administrated with 0%–4.0% HC; casein: OVX+casein (1%) group.	HC MW: 3 kDa	Porcine	0%, 0.1%, 0.3%, 1%, 4.0% HC	12 weeks	BMD of whole body and lumbar vertebrae: ↗ (in a dose dependant manner) Femur BMD is not affected by HC treatment.	Kim et al. 2013
		n= 32 female C3H/HeN mice (3-month-old) 3 groups: 8 animals / group control (SHAM-operated) vs. OVX vs. OVX with HC (OVX-CH)	HC MW: 5 kDa	Porcine	Ingestion of 1000 mg HC /kg or and 2500 mg HC/kg body weight .	12 weeks	↗ BMD for OVX (25 g/kg of HC) ↘ CTX level ↗ bone strength (OVX mice 25 g/kg HC)	Guillermine et al. 2010
		n= 64 female C3H/HeN mice (6-week-old) 2 SHAM groups and 6 OVX groups (3-month-old and 6-month-old)	HC MW: 5 kDa	Porcine	Ingestion of 1000 mg HC /kg or and 2500 mg HC/kg body weight .	26 weeks	↘ bone loss for OVX (25 g/kg of HC) ↗ diameter of the cortical areas of femurs	Guillermine et al. 2012
		n= 70 female C3H/HeN mice (3-month-old) 2 SHAM groups and 5 OVX groups	HC MW: 5 kDa	Porcine	0 or 2500 mg/kg	12 weeks + 4 additional weeks	HC as efficient as raloxifene	Guillermine et al. 2012
		n= 50 female C3H/HeN mice (9-week-old) 2 groups (SHAM) and 3 groups OVX	HC MW: 2 kDa and 5 kDa	Bovine	2.5% of the diet 15% casein, 17.5% casein or 15% casein plus 2.5% HC	8 weeks	BMD of the femur: ↗ with HC 2kDa	Daneault et al. 2014
	Bone healing models	n= 30 IGS male rats (7-week-old) 3 groups	Collagen tripeptide (Ctp)	Porcine skin	0, 80, or 500 mg/kg/day	12 weeks	Fracture healing acceleration.	Tsuruoka et al. 2007
		n=8 female Wistar/ST rats (11 week-old)	High Advanced- Collagen Tripeptide (HACP)	Hog skin	80mg/2ml/kg body weight	3 weeks	Beneficial effect on bone healing process	Hata et al. 2008

Table 2 : Clinical studies on HC in bone biology

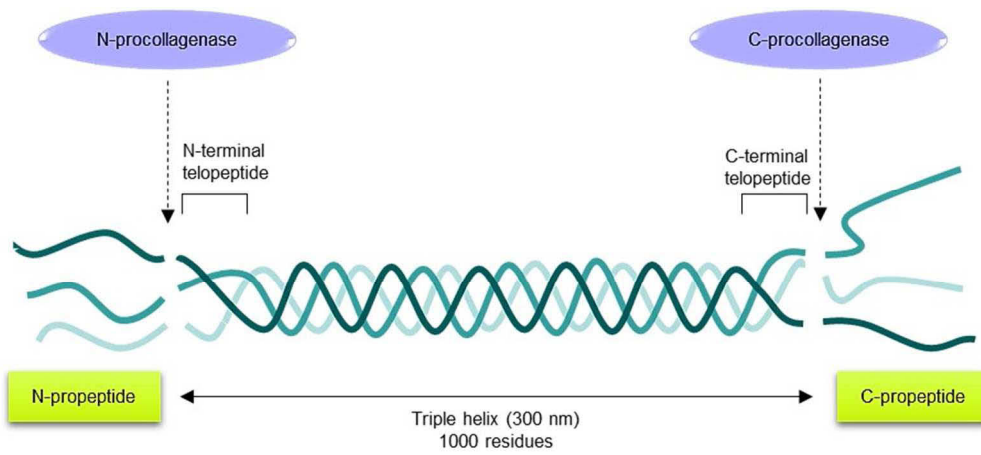
	Model/ species	Number/ groups	Product	Origin	Dose	Duration of treatment	Effect of treatment	Ref
Clinical studies	Post menopausal women	n=94 Calcitonin alone vs Calcitonin+HC	HC	-	10g / day	24 weeks	Levels of urinary pyridinoline cross-links: ↗	Adam et al. 1996
		n= 71 Control vs HC	HC	-	10g / day	24 weeks	No effect The majority of patients : inadequate calcium intake + excess body weight	Cuneo et al. 2010
		n=29 Control vs. CC	Calcium-collagen chelate (CC)	-	5 g of CC + 500 mg calcium carbonate + 5 µg vitamin D (Control: 500 mg calcium carbonate + 5 µg vitamin D)	3 months	bAPL/TRAP5b ratio: ↗ Total BMD: ↗	Hooshmand et al. 2013
		n=39 Control vs. CC	Calcium-collagen chelate (CC)	-	5 g of CC + 500 mg calcium carbonate + 5 µg vitamin D (Control: 500 mg calcium carbonate + 5 µg vitamin D)	12 months	Whole body BMD: □ in CC group ↘ sclérostin ↘ Trap5b ↗ bALP ↗ bALP/Trap5b ratio	Elam et al. 2014
	Pre-pubertal children	n=60 Control (G-I) vs. Collagen (G-II) vs. Collagen + calcium (G-III)	Partially HC (gelatine)	-	250mL of the product/day Gelatine content is not specified	4 months	serum IGF-1: G-III > G-II or G-I ALP: G-III > G-I (p < 0.05)	Martin-Bautista et al. 2011

Table 3 : *In vitro* studies on HC in bone biology

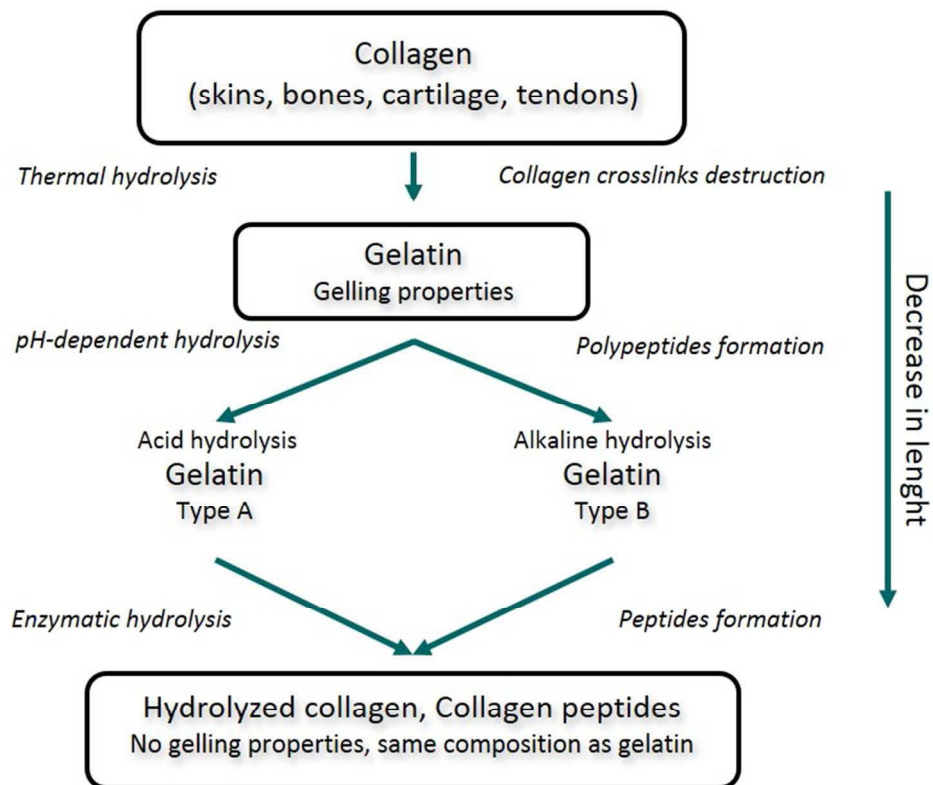
	Model/ species	Number/ groups	Product	Origin	Dose	Duration of treatment	Effect of treatment	Ref
<i>In vitro</i> studies	Osteoblasts	Human osteoblastic MG-63 cells	HC <3 kDa: selected MW: 1.4 kDa	-	0, 10, 25, 50 et 100 µg/mL	-	Cell proliferation: ↗ (dose-dependent) ALP activity: ↗ (dose-dependent) Collagen synthesis and collagen, type1, alpha1 (COL1A1) gene expression: ↗ CH-induced COL1A1 gene expression was completely abolished by extracellular signal-regulated kinase (ERK) inhibitor	Kim et al. 20013
		Primary tissue co-culture	HC MW: 2 and 5 kDa	Bovine, porcine and fish	0.2, 0.5 and 1.0 mg/mL	-	Cell growth : = ALP activity: ↗ (dose-dependent)	Guillerminet et al. 2010
		MC3T3-E1 cells (subclone 4)	HC MW: 2 kDa	Bovine, porcine and fish	0.2, 0.5 and 1.0 mg/mL	-	Absence of cytotoxicity Cell proliferation: ↗ ALP activity : ↗ Ca/P nodule formation: o in MC3T3-E1 cultures	Daneault et al. 2014
		hFOB1.19	Collagen tripeptide (Ctp)	Porcine skin	10 µg/ml	-	Calcification: ↗ Type I collagen protein production + its mRNA levels: ↗ Ctp upregulated Osterix.	Tsuruoka et al. 2007
		hFOB1.19	Gelatin hydrolysate degree of hydrolysis of 4,7-13,5%	Chum salmon skin	0, 0.005, 0.01, 0.02, 0.05, 0.1 mg/mL	-	Cell growth proliferation Cell cycle progression acceleration Cell apoptosis inhibition Cell proliferation: ↗ with gelatin prepared with papain protease	Fu et al. 2013
		Human osteoblastic MG-63 cells	HC	-	-	-	Cell proliferation: ↗ ALP activity: ↗ Collagen synthesis: ↗ Calcium deposition: ↗ HC activated ERK1/2, JNK1/2, p38, and ELK1 phosphorylation except cJUN. COL1A1, ALPL, BGLAP, and osteopontin gene expressions : ↗	Kim et al. 2014a
		MC3T3-E1 cells (subclone 4)	Collagen peptide MW: 0.6–2.5 kDa	Bovine	0.1–6 mg/mL Best concentration:3 mg/mL.	-	Cell proliferation: ↗ Percentage of MC3T3-E1 cells in G2/S phase: ↗ Runx2 expression, ALP activity, and OC production:↗ Mineralization: ↗	Liu et al. 2014
		NOS-1 human osteosarcoma	Collagen peptide MW: 3kDa (0.5–10kDa)	Cod skin and bone	ALP: 0.0005, 0.005, 0.05, 0.1 and 0.5% Best concentration:.. 0.1%	-	ALP activity : ↗ Cell proliferation: ↗ Osteocalcin, osteopontin, BMP-2 and integrin β3 mRNAs expression: ↗ Osteopontin and integrin β3 expression levels: ↗ Osteocalcin, osteopontin and integrin β3 proteins: ↗ Matrix mineralization: ↗	Yamada, Yoshizawa, et al. 2013
		MC3T3-E1 cells (subclone 4)	Collagen peptide MW: ≈ 2-8 kDa hydroxyproline content:≈5%	Fish	RT-PCR: 0.05, 0.1, 0.2 and 0.5% (w/v) of FCP Best concentration: 0.2%	-	Lysine hydroxylation,levels of hydroxylysine-aldehyde derived cross-links and cross-link maturation : ↗ Collagen synthesis, quality and mineralization: ↗	Yamada, Nagaoka, et al. 2013
	Osteoclasts	Primary tissue co-culture	HC MW: 2 and 5 kDa	Bovine, porcine and fish	0.2, 0.5 and 1.0 mg/mL	-	No effects on cell growth . ALP activity: ↗ (dose-dependent)	Guillerminet et al. 2010

Table 1-S: Characteristics of the different collagen families

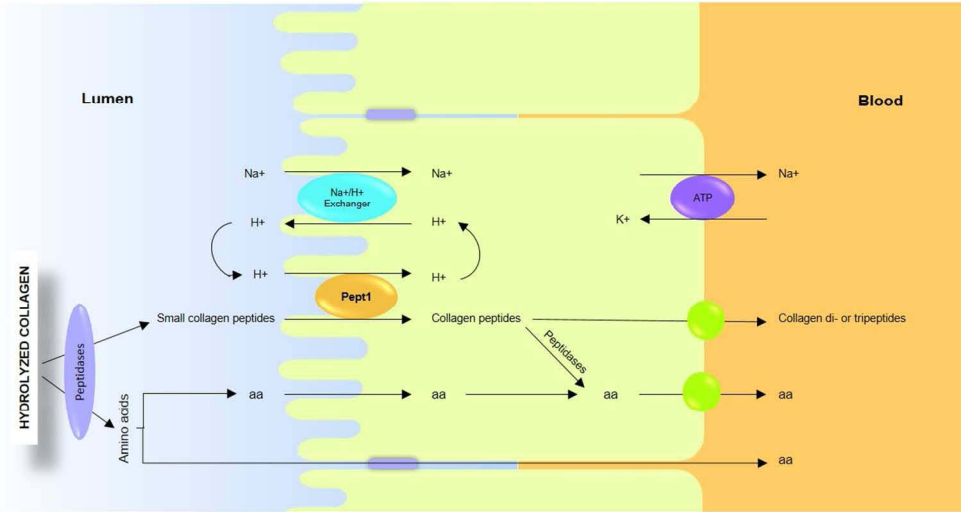
	Type	Molecular composition	Genes	Tissue distribution
<i>Fibril forming collagens</i>				
	I	$[\alpha 1(I)]_2 \alpha 2(I)$	COL1A1, COL1A2	Bone, dermis, tendon, ligaments, cornea
	II	$[\alpha 1(II)]_3$	COL2A1	Cartilage, vitreous body, nucleus pulposus
	III	$[\alpha 1(III)]_3$	COL3A1	Skin, vessel, reticular fibres of most tissues (lungs, liver, spleen etc.)
	V	$\alpha 1(V) \alpha 2(V) \alpha 3(V)$	COL5A1, COL5A2, COL5A3	Lung, cornea, bone, fetal membranes; together with type I
	XI	$\alpha 1(XI) \alpha 2(XI) \alpha 3(XI)$	COL11A1, COL11A2, COL11A3 (COL2A1)	Cartilage, vitreous body
<i>Fibrillar-like collagens (type C clade):</i>				
	XXIV	-	COL24A1	Coexpressed with type I collagen in the developing bone and eye
	XXVII	-	COL27A1	Cartilage and epithelial cell layers in developing tissues including stomach, lung, gonad, skin, cochlear, and tooth
<i>Microfibrillar collagens</i>				
	VI	$\alpha 1(VI) \alpha 2(VI) \alpha 3(VI) \alpha 6(VI)$	COL6A1, COL6A2, COL6A3, COL6A5 (COL29A1), COL6A6	Dermis, epidermis, cartilage, placenta, lungs, vessel wall, intervertebral disc
<i>Anchoring fibrils</i>				
	VII	$[\alpha 1(VII)]_3$	COL7A1	Skin, dermal-epidermal junctions; oral mucosa, cervix
<i>FACIT collagens (fibril-associated collagens with interrupted triple helices)</i>				
	IX	$\alpha 1(IX) \alpha 2(IX) \alpha 3(IX)$	COL9A1, COL9A2, COL9A3	Cartilage, vitreous humor, cornea
	XII	$[\alpha 1(XII)]_3$	COL12A1	Perichondrium, ligaments, tendon
	XIV	$[\alpha 1(XIV)]_3$	COL14A1	Dermis, tendon, vessel wall, placenta, lungs, liver, embryonic heart
	XX	-	COL20A1	Corneal epithelium, embryonic skin, sternal cartilage, tendon
	XXVI	-	COL26A1	Testis, ovary
<i>FACIT-like collagens:</i>				
	XVI	$[\alpha 1(XVI)]_3$	COL16A1	Fibroblasts, amnion, keratinocytes
	XIX	-	COL19A1	Human rhabdomyosarcoma
	XXI	-	COL21A1	Blood vessel
	XXII	-	COL22A1	Tissue junction: myotendinous junction in skeletal and heart muscle, the articular cartilage-synovial fluid junction, or the border between the anagen hair follicle and the dermis in the skin
<i>Basement membrane collagens</i>				
	IV	$[\alpha 1(IV)]_2 \alpha 1(IV) \alpha 6(IV) \dots$	COL4A1, COL4A2, COL4A3, COL4A4, COL4A5, COL4A6	Basement membranes
<i>MACIT collagens (membrane-associated collagens with interrupted triple helices)</i>				
	XIII	-	COL13A1	Epidermis, hair follicle, endomysium, intestine, chondrocytes, lungs, liver
	XVII	$[\alpha 1(XVII)]_3$	COL17A1	Dermal-epidermal junctions
	XXIII	-	COL23A1	Lung, cornea, brain, skin, tendon, and kidney
	XXV	-	COL25A1	Brain
<i>Hexagonal network-forming collagens</i>				
	VIII	$[\alpha 1(VIII)]_2 \alpha 2(VIII)$	COL8A1, COL8A2	Endothelial cells, Descemet's membrane
	X	$[\alpha 3(X)]_3$	COL10A1	Hypertrophic cartilage
<i>Multiplexin family (multiple triple helix domains with interruptions)</i>				
	XV	$[\alpha 1(XV)]_3$	COL15A1	Highly expressed in heart, skeletal muscles and the placenta and moderately expressed in the adrenal gland, kidney and pancreas
	XVIII	-	COL18A1	Lungs, liver
<i>Collagen containing von Willebrand factor type A domains</i>				
	XXVIII	-	COL28A1	Adult sciatic nerve



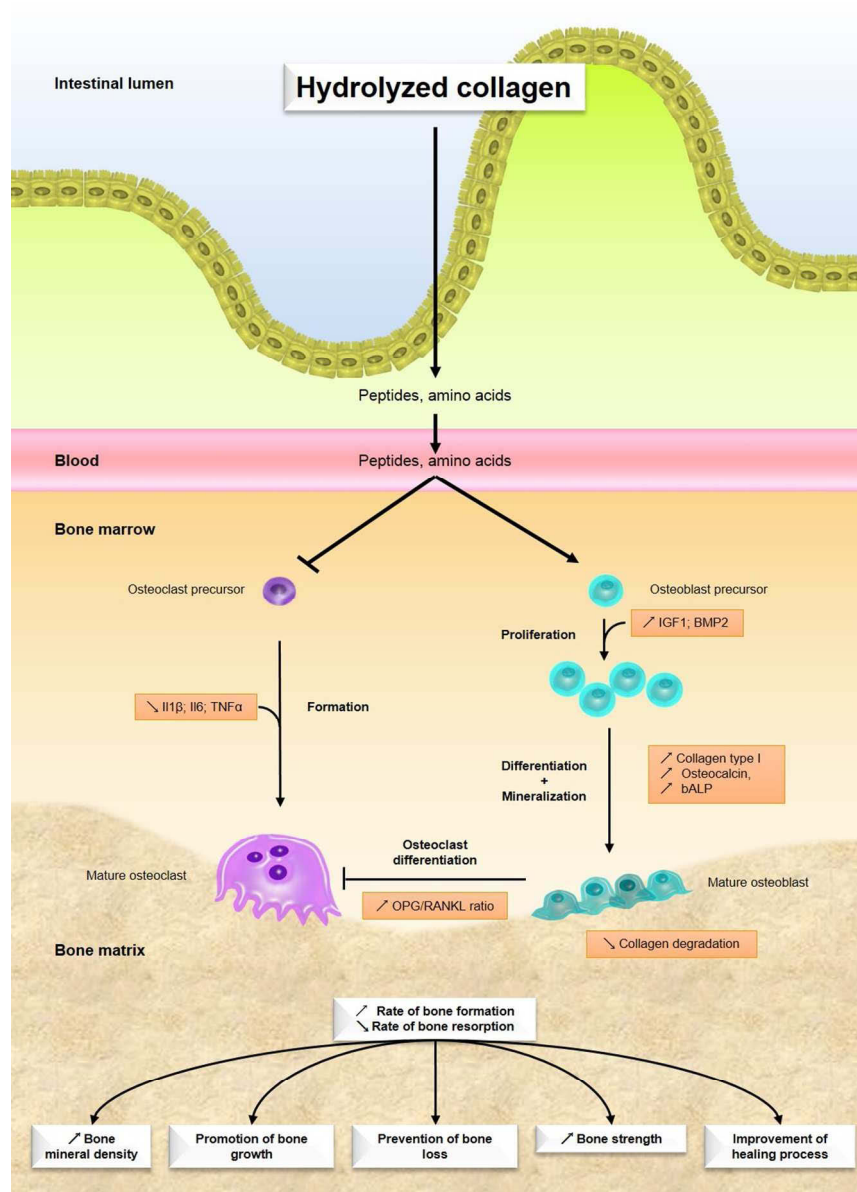
The collagen triple helix
320x146mm (72 x 72 DPI)



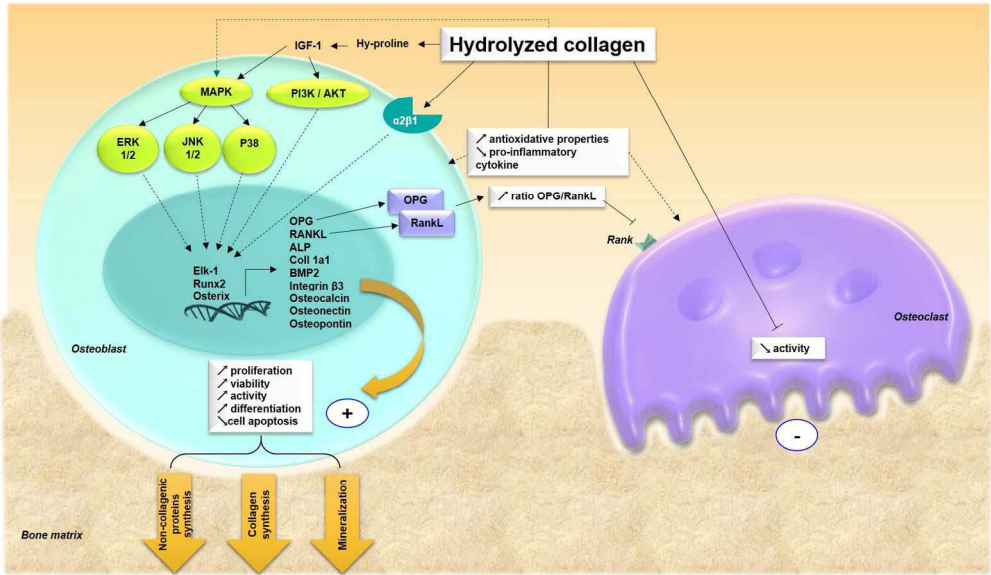
From collagen to gelatin and hydrolyzed collagen
292x239mm (72 x 72 DPI)



Mechanisms of hydrolyzed collagen intestinal absorption
460x235mm (72 x 72 DPI)



Integrated viewpoint of hydrolyzed collagen effects on bone remodeling process
400x560mm (72 x 72 DPI)



Supposed cellular and molecular mechanisms of hydrolyzed collagen action on bone
655x379mm (72 x 72 DPI)

Article 2



BOVINE HYDROLYZED COLLAGEN PROMOTES BONE HEALTH IN OVARIECTOMIZED MICE THROUGH MODULATION OF OSTEOBLAST AND OSTEOCLAST COUPLING

Audrey Daneault, Janne Prawitt, Véronique Fabien Soulé, Véronique Coxam and Yohann Wittrant

Article soumis au *Journal of Functional Foods*

En raison de l'augmentation de l'espérance de vie, les maladies chroniques liées à l'âge telles que l'ostéoporose sont devenues un enjeu majeur de santé publique nécessitant une gestion innovante. Dans cette optique, les protéines peuvent être des candidats pertinents car ils fournissent des éléments essentiels pour la formation osseuse et exercent des fonctions de régulations spécifiques de l'activité des cellules osseuses. Le collagène en particulier est une composante essentielle de la matrice osseuse et ses dérivés sont largement utilisés dans l'industrie alimentaire, on peut soulever la question de savoir si les régimes enrichis en collagène peuvent offrir des avantages pour le squelette. Dans cette étude, nous avons démontré que le collagène hydrolysé (HC) d'origine bovine contribue à limiter la perte osseuse induite par l'ovariectomie lorsque les souris ont été complétées avec 2,5%. Cette limitation dans ce modèle n'est pas liée à la teneur en protéines, mais à un effet bien spécifique du HC. La préservation de l'os par le HC est dépendante de la masse moléculaire moyenne et est produite, au moins en partie, par la modulation des taux circulants d'OPG et de RANKL. Par conséquent, en expérimentation *ex vivo*, le HC stimule l'activité des ostéoblastes en réprimant la formation d'ostéoclastes. D'un point de vue intégratif, nous avons mis en évidence que le HC peut représenter une alternative pertinente à la conception de futures approches nutritionnelles pour gérer la prévention de l'ostéoporose.

BOVINE HYDROLYZED COLLAGEN PROMOTES BONE HEALTH IN OVARECTOMIZED MICE THROUGH MODULATION OF OSTEOBLAST AND OSTEOCLAST COUPLING.

Audrey Daneault^{1,2,3}, Janne Prawitt⁴, Véronique Fabien Soulé³, Véronique Coxam^{1,2} and
Yohann Wittrant^{1,2*}

1. INRA, UMR 1019, UNH, CRNH Auvergne, F-63009 CLERMONT-FERRAND, FRANCE

2. Clermont Université, Université d'Auvergne, Unité de Nutrition Humaine, BP 10448, F-63000 CLERMONT-FERRAND, FRANCE

3. Rousselot SAS, 4 rue de l'abreuvoir, 92400 COURBEVOIE, FRANCE

4. Rousselot BVBA, Meulestedekaai 81, 9000 GENT, BELGIUM

*Corresponding author: yohann.wittrant@clermont.inra.fr

Keywords: Collagen · Hydrolyzed collagen · Osteoblasts · Osteoclasts · Osteoporosis

Abstract

Due to the increase of life expectancy, age-related chronic diseases such as osteoporosis have become a major health issue requiring innovative management. In this light, proteins may stand as relevant candidates as they provide building blocks for bone formation and exert specific regulatory functions in bone cell activity. More specifically, since collagen proteins are a crucial component of bone matrix and collagen-derived products are widely used in food industry, one may raise the question whether collagen-enriched diets may provide benefits for the skeleton. In this study we demonstrated that hydrolyzed collagen (HC) from bovine origin contributes to limit bone loss induced by ovariectomy when mice were supplemented with 2.5% (g of HC / 100g of diet). Limitation of bone loss in this model was not related to protein content but to a hydrolyzed collagen specific effect. Bone preservation by HC was dependent on mean molecular weight and occurred, at least partly, through the modulation of the OPG and RANKL circulating levels. Accordingly, *ex vivo*, HC was found to stimulate osteoblast activity while repressing osteoclast formation. From an integrative view point, we further evidenced that HC may represent a relevant alternative in the design of future nutritional approaches to manage osteoporosis prevention.

Keywords: Hydrolyzed Collagen, Bone, Osteoporosis, Nutrition, RANKL

Introduction

Osteoporosis is considered as a major cause of morbidity, disability and as an important contributor to medical care costs worldwide. It is defined as a skeletal disorder characterized by a low bone mineral density and micro-architectural alterations of bone tissue predisposing to an increased risk of fracture (1993; NIH, 2000). Several drugs are available for the treatment of osteoporosis but concerns about compliance and possible side effects such as cancer and cardiovascular diseases have been raised. Therefore implementation of new strategies with proven scientific and clinical value for the prevention of osteoporosis are strongly encouraged (Coxam, Davicco, & Demigne, 2008). In this line, dietary intervention may offer an effective mean to deal with the problem of osteoporosis and its complications (Lotters et al., 2013). The primary goal of a nutritional strategy for the prevention of bone loss is to provide a sufficiently bioavailable amount of constitutive elements such as calcium, proteins as well as nutrients endowed with specific bone sparing properties (proteins, some fatty acids, micronutrients...) (Coxam et al., 2008; Nieves, 2013). Based on this concept and because proteins play a major role in bone by providing building blocks and by exerting specific regulatory functions collagen may provide a new option for aging consumers to maintain bone health. Nevertheless, scientific background needs to be reinforced based on clinical trials, preclinical investigations and mechanistic studies to substantiate a health claim.

Collagens represent 30% of the total protein mass in the body (Ricard-Blum, 2011) and are therefore the most abundant proteins in mammals. In bone, collagen plays an important role in the force transmission and tissue structure maintenance. Importantly, it determines the amount of mineral deposition. Thus the capacity of bone to resist to mechanical forces and fractures depends not only on the quantity of bone tissue (mineralization) but also on its quality (organization of the collagen framework) (Currey, 2003; Viguet-Carrin, Garnero, & Delmas,

2006). Collagen and its derivatives (gelatin and hydrolyzed collagen) are also widely used in food, cosmetic and pharmaceutical industries.

If hydrolyzed collagen (HC) has already been used as a food supplement to sooth pain in patients suffering from osteoarthritis, only a few clinical studies have evaluated its effects on bone metabolism (Bagchi et al., 2002; Bruyere, Zegels, et al., 2012; Fujita, Ohue, Fujii, Miyauchi, & Takagi, 2002; Henrotin, Lambert, Couchourel, Ripoll, & Chiotelli, 2011; Moskowitz, 2000; Trc & Bohmova, 2011). In addition, in most of the studies, HC was used in association with other drugs or food supplements (Elam et al., 2014; Hooshmand et al., 2013). Besides, although the existing data on HC effects on bone health in humans is promising, the Group for the Respect of Ethics and Excellence in Science has comprehensively outlined (Bruyere, Rizzoli, et al., 2012), that further studies are warranted to strengthen the scientific evidences and determine the pathways that mediate HC effects on bone health. Therefore, in this manuscript we investigated whether HC and in particular HC form bovine origin (BHC) may contribute to bone health, whether process may modulate observed effects and how BHC may exert its effects on bone.

Materials and methods

Ethics. All animal procedures were approved by the institution's animal welfare committee (Comité d'Ethique en Matière d'Expérimentation Animale Auvergne: CEMEAA) and were conducted in accordance with the European guidelines for the care and use of laboratory animals (CE 62-12 and 63-12). Animals were housed in the animal facility of the INRA Research for Human Nutrition (Agreement N°:C6334514). Throughout the study, animals were housed in a controlled environment (12:12 h light-dark cycle, 20-22°C, 50-60% relative humidity, 1 mouse per plastic cage with free access to water and food). At the end of the protocol, blood was withdrawn by the retro-orbital technique on anesthetized animals. Then, animals were sacrificed by cervical dislocation and tissues were harvested, frozen and stocked prior to investigation.

Hydrolyzed collagen. Enzymatically hydrolyzed collagen was provided by Rousselot SAS, (Courbevoie, France), from the Rousselot Peptan® range. The HC were from bovine origin with mean molecular weights of 2kDa (Peptan® B coded BHC 2000). Bovine Serum Albumin (BSA, PAA Laboratories GmbH, Austria) and hydrolyzed casein (Vitalarmor - Armor Protéines, St Brice en Coglès, France) were used as control for *in vitro* experiments and hydrolyzed collagen-enriched serum production.

Animal model (1): bone loss model. Nine-week-old female C3H/HeN mice were purchased from JANVIER (St Berthevin, France). Mice were randomly divided into 6 distinct groups (n=10 per group) after a two week acclimatization period and housed individually for the total duration of the experiment (8 weeks). Four groups were surgically ovariectomized (OVX), two groups were sham-operated (SH). Mice were either given a standard diet (modified from the AIN-93M powdered diet and containing 15% or 17.5% of casein) or a diet containing 2.5% of bovine hydrolyzed collagen of 2kDa (BHC 2000). Groups are therefore as following: SHAM 15% ; SHAM 17.5%; OVX 15% ; OVX 17.5% and OVX15% + 2.5% of BHC2000. Diets

purchased from the UPAGE (Unité de Préparation des Aliments Expérimentaux – INRA Jouy en Josas, France) are described in Table 1. The experimental dose for BHC in the present study was set equivalent to the corresponding nutritional dose of 10g of HC per day for a 60-kg human subject.

Body mass and composition. Mice were weighed every week throughout the experimental period and subjected to body composition analysis monthly using the QMR EchoMRI- 900™ system. Whole body fat and lean mass were measured in live animals without anesthesia or sedation.

Bone morphological analysis. After removing soft tissues, left femurs were placed in PBS buffer with 10% formaldehyde at 4°C. Bone mineral density was measured using an eXplore CT 120 scanner (GE Healthcare, Canada). Acquisitions were performed with X-ray tube settings at 100 kV and 50 mA. We limited our investigation to the distal trabecular region.

Tissue weight analysis. Spleen and uterus were collected from mice and weighed immediately after sacrifice.

Animal model (2): Metabolism model and serum production. After a 2 week acclimatization, twenty four female C3H/HeN mice were randomly divided into 8 groups (n=3). Mice were force-fed with 100µl of a 50% hydrolyzed collagen solution (physiological serum). Serum collection was performed under 1% isoflurane anesthesia at 0h, 0.5h, 1h, 2h, 3h, 6h, 9h and 24 hours after administration to determine the maximum absorption peak. Hydroxyproline content in serum was measured using a commercially available assay (Kit 6017; Chondrex, Inc., Redmond, Washington). In a second experiment, thirty nine-week-old female C3H/HeN were randomly divided in 3 groups (n=10). Mice were force-fed with either 100µl of physiological serum (vehicule), 100µl of a 50% hydrolyzed casein solution or 100µl of a 50% BHC2000 solution. Serum collection was performed under 1% isoflurane anesthesia at 0.5h after administration.

Biochemical parameters. Blood samples were collected in plain tubes, and were centrifuged (10,000G for 5 min at room temperature). Serum was subsequently isolated, aliquoted and stored at -80°C. PINP and CTX-1 were measured using the mouse enzyme immunoassay kit (ImmunoDiagnosticSystem) according to the manufacturer's instructions. OPG, RANKL and MCP-1 were measured by Quantikine ELISA for mouse (R&D Systems Europe).

Cell cultures.

MC3T3-E1, clone 4. Pre-osteoblasts (MC3T3-E1, clone 4) were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC® Number : CRL-2593™). Cells were seeded at the density of 10^4 cells/cm² in α -MEM medium supplemented with 10% Fetal Calf Serum (FCS) (control medium) and cultured at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ in air. The medium was replaced every 2 days. At 80% confluence, cultures were subjected to different assays and then cultured either in control medium alone (2, 7.5 or 10% FCS) or in the presence of β -glycerophosphate (5mM) and ascorbic acid (25 μ g/ml) for osteoblast differentiation assays, or in combination either with BSA (0.5 to 1 mg/ml), BHC2000 (0.5 to 1 mg/ml) or with enriched serum (7.5% FCS + 2.5% enriched serum).

Raw264.7 cultures. The murine osteoclast precursor cell line RAW264.7 was obtained from the American Type Culture Collection (ATCC® Number: TIB-71™). Cells were seeded at the density of 10^4 cells/cm² in α -MEM medium supplemented with 10% Fetal Calf Serum (FCS) (control medium) and cultured at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ in air. The medium was replaced every 2 days. At 80% confluence, cultures were subjected to different assays and then cultured either in control medium alone (2, 7.5 or 10% FCS) or in the presence of medium [recombinant-murine-RANKL (25 ng/ml) (R&DSYSTEMS)] for osteoclast differentiation assays, or in combination either with BSA (0.5 to 1 mg/ml), BHC2000 (0.5 to 1 mg/ml) or with enriched serum (7.5% FCS + 2.5% enriched serum). Cultures were harvested after four days.

Primary bone marrow cultures. Bone marrow cells were isolated from the femur marrow cavity excised from 3- to 5-week-old female C3H/HeN mice. Cells were washed and plated in α -MEM supplemented with 10% FCS at a density of 2.5×10^6 cells/cm² and cultured at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ in air. The medium was replaced every 2 days. Cultures were subjected to different assays and then cultured either in control medium alone (2, 7.5 or 10% FCS) or in the presence of medium [recombinant-murine-RANKL (25 ng/ml) (R&DSystems)] for osteoclast differentiation assays, or in combination either with BSA (0.5 to 1 mg/ml), BHC2000 (0.5 to 1 mg/ml) or with enriched serum (7.5% FCS + 2.5% enriched serum). Cultures were harvested after seven days.

Time lapse microscopy. RAW264.7 cells were seeded onto plastic wells (24 well plates) and transferred on the motorised stage of a Axio Observer.Z1 microscope. During videomicroscopy cells were kept in controlled environment chamber at 37°C, 5% CO₂. Cells were imaged every 20 minutes for 96 hours with the objectif EC Plan-Neofluar 10x/0,3 Ph1 M27). Images were proceeded using the ZEN software (ZEISS, France).

Cell proliferation. The cell proliferation was determined using an XTT-based method (Cell Proliferation Kit II, Sigma-Aldrich) according to the supplier's recommendations. Optical density was measured at 450 nm.

Alkaline phosphatase activity assays. Enzymatic alkaline phosphatase (ALP) activity was kinetically measured after 0, 3 and 7 days of treatment. At the end of the protocol, cells were washed twice with ice-cold PBS Cells were lysed by freeze-thaw cycles and lysates underwent homogenization in 200 μ l of 1 M diethanoamine/0.24 mM magnesium chloride hexahydrate buffer at pH 9.8. Cell lysate (10 μ l) was added to 200 μ l of p-nitrophenyl phosphate solution (16.2 mM) and the absorbance was measured at 405 nm every 2 min for 30 min. Protein amounts were quantified to express data as the mean OD per minute per milligram of protein.

Mineralization assays: Alizarin red staining. MC3T3-E1 pre-osteoblasts were cultured in α -MEM medium supplemented with 10% FCS in the presence of 25 μ g/ml ascorbic acid and 5mM β -glycerophosphate for 21 days. At the end of the protocol, cells were washed twice with ice-cold PBS and fixed with frozen ethanol (70%). Mineralized nodules were stained with Alizarin Red S solution (Sigma) at 40mM for 30 minutes. Mineralization was evaluated by light microscopy and quantified by ImageJ software.

Taqman Low Density Arrays (TLDA). Total RNA was extracted using TRIzol reagent (Life Technology), following the manufacturer's instructions. RNA was converted to cDNA using the high capacity cDNA reverse transcription (RT) kit (Applied Biosystems). Resulting cDNA was used for TaqMan® low-density arrays (TLDA) (Applied Biosystems 7900HT real-time PCR system). Relative expression values were calculated using the comparative threshold cycle ($2^{-\Delta\Delta CT}$) according to Data Assist software (Applied Biosystems). 18S, GAPDH and actin served as housekeeping genes.

Statistical analysis. Statistical analyses were carried out using ExcelStat Pro software - Microsoft Office 2010 with the data expressed as means $\pm$ SD. One-way ANOVA or T-test were performed. Groups with significant differences ($p < 0.05$) are indicated with different letters or (* *versus*).

Results

Bovine hydrolyzed collagen promotes osteoblast differentiation and function

We first evidenced that bovine hydrolyzed collagen (BHC 2000) significantly stimulates osteoblast proliferation (figure 1A). Interestingly, it was 3 times higher than observed with control BSA, indicating that stimulation was likely related to a BHC specific effect rather than an effect mediated by the presence of proteins. Alkaline phosphatase activity (figure 1B) and mineralization assays (figure 1C) were also performed to test the effect of BHC on osteoblast differentiation. After 3 days of culture, no significant effect was observed on alkaline phosphatase activity. However, after 7 days, BHC significantly enhanced ALP activity in MC3T3-E1 cells when compared to BSA (figure 1B). Accordingly, mineralization kinetics revealed that BHC was able to promote early nodule formation (figure 1C). This promotion occurred in a dose dependent fashion supporting the rationale for further investigation on its potential bone sparing effect.

BHC 2000 significantly reduces bone loss *in vivo* and this is not related to a protein effect

Subsequent to the positive *in vitro* results, BHC was subjected to preclinical investigations. Mice were ovariectomized to induce bone loss and mimic post-menopausal osteoporosis features. We first validated our model. Successful ovariectomy was confirmed by uterus atrophy (figure 2A) and subsequent bone loss was established by BMD analysis (figure 2B). BHC 2000 showed a slight but significant prevention of bone loss (+3.8%) while the iso-proteinic diet (casein 17.5%) failed to significantly counteract bone alteration, supporting that although weak, the beneficial effect of BHC2000 on bone loss was specific. Regarding potential confounding parameters, food intakes were monitored and evidenced that the type of the diet had no influence on the mice's feeding behavior (figure 3A). However, ovariectomy was likely to increase mice body weight (figure 3B). Body composition analysis revealed that lean mass

remained stable among the groups and during the experiment while fat mass increased (figure 3C and 3D). This increase was related to the ovariectomy and paralleled with the observed body weight gain in the OVX groups (figure 3E).

OPG/RANKL ratio is involved in the BHC2000 effect on bone

To elucidate the mechanisms involved in the positive influence of BHC2000, bone remodeling parameters were studied. As inflammation is a well acknowledged bone modulator, total spleen weight and circulating amount of MCP-1 were analyzed. Diet showed no significant effect on these parameters (figure 4A and B). In the same trends, measurements of circulating PINP and CTX-1 were performed but data revealed a lack of significant influence (figure 4C and D). Regarding bone cell coupling, ovariectomy tends to decrease OPG while significantly up-rising RANKL circulating levels (figure 4E and F). From a diet view point, BHC2000 showed a significant reduction of RANKL when compared to OVX17.5%. BHC2000 did not significantly influence OPG levels when compared to OVX 17.5%. However, consistent with the limitation of RANKL induction by the ovariectomy, BHC2000 showed a trend ($p=0.07$) in influencing RANKL/OPG ratio suggesting a specific action on osteoblast/osteoclast coupling (data not presented).

HC metabolites rapidly enter the blood stream

To insure plasma enrichment in metabolites of interest for *ex-vivo* experiments, mice were force-fed with BHC2000 and the absorption peak was kinetically monitored by hydroxyproline level analysis for 24 hours. As shown in figure 5, the hydroxyproline concentration rapidly increased in the blood reaching a maximum concentration between 30min and 1 hour following the gavage. Thus, enriched plasma collection was set at 30 min post-gavage either with BHC2000 or hydrolyzed casein.

BHC2000 improves osteoblast activity

In a more physiologic approach, MC3T3-E1 pre-osteoblasts were incubated with metabolite-enriched blood samples collected from forced-fed mice. We first check the impact of enriched plasma on cell viability. No significant influence was observed on day 1 and day 2 (figure 6A). In contrast, after one week of incubation significant differences were found. Only cells cultured in the presence of 2% serum from BHC 2000- fed mice showed a similar proliferation rate to the positive control (2% FCS). Cell proliferation stopped in the negative control (C-) and was significantly lowered when cell were cultured with control (CTRL) or hydrolyzed casein enriched serum. To further investigate this potential positive impact on osteoblast, cells were subjected to mineralization assays. Consistent with the XTT data, BHC 2000 serum significantly enhanced the formation of mineralized nodules when compared either to the CTRL serum or the protein control (hydrolyzed casein serum), thus supporting that HC, and in particular BHC 2000, may favor osteoblast bone formation through a specific way of action as hydrolyzed casein failed to exert a similar influence (figure 6 B and C).

BHC2000 delays osteoclastogenesis

We then investigated the impact of HC on osteoclast behavior. As for osteoblasts, the effect on proliferation was checked. In our hands, BHC 2000 enriched serum decreased OC proliferation (-50% when compared to CTRL serum) providing an additional explanation for the positive impact of BHC 2000 on bone loss prevention (figure 7A). However, in contrast to what was observed for osteoblasts, hydrolyzed casein serum also impacted osteoclast proliferation supporting an action dependent on the presence of protein rather than a BHC 2000 specific effect. Then, osteoclast differentiation was investigated and multinucleated cell formation was monitored by videomicroscopy. Interestingly, in contrast to proliferation data, BHC2000 specifically delayed giant cell formation as observed after 4 days of differentiation (figure 7B). To confirm a possible inhibition of osteoclastogenesis, cultures with both RAW264.7 and primary bone marrow cells were harvested for osteoclast marker expression. Consistent with

the delay in osteoclast formation, BHC2000 induced a reduction of the expression level of different markers related to osteoclast differentiation, maturation and activity (tables 2 and 3).

Discussion

In this study we demonstrated that (1) hydrolyzed collagen from bovine origin contributes to limit bone loss induced by ovariectomy when mice were supplemented with 3g/day/kg of body weight (2.5% of the diet). (2) Limitation of bone loss by BHC in this model was not related to the protein content but to a BHC specific effect. (3) Bone preservation by BHC occurred, at least partly, through the modulation of the OPG/RANKL ratio. (4) Accordingly, *ex vivo*, BHC was found to stimulate osteoblast activity while repressing osteoclast formation.

Hydrolyzed collagen has already been used as a food supplement to sooth pain in patients suffering from osteoarthritis, but only a few clinical studies have evaluated its effects on bone metabolism (Bagchi et al., 2002; Bruyere, Zegels, et al., 2012; Fujita et al., 2002; Henrotin et al., 2011; Moskowitz, 2000; Trc & Bohmova, 2011). Moreover, in most of the studies, HC was used in association with other compounds such as drugs or food supplements (Elam et al., 2014; Hooshmand et al., 2013). Interestingly, Guillerminet et al. previously demonstrated in a preclinical approach, that HC administration to 3 and 6- month old OVX C3H/HeN mice increased bone mineral density and bone strength (Guillerminet et al., 2010; Guillerminet et al., 2012). Despite major differences in the model design (experimental duration: 5 weeks versus 26 weeks / percentage of total protein content: 15% versus 20% / HC content: 3 versus 25g/day/ ...) these data nicely parallel with ours.

In this study, bone prevention occurred without any change in food habits. Intakes were the same among the groups and observed effects could not be related to such a bias. In addition, as mechanical loading may contribute to prevent bone loss we further demonstrated that only estrogen deficiency led to weight gain. Diet had no effect on this parameter. Therefore, BHC2000 positive effect on bone could not be attributed to loading stimulation.

Weight gain in ovariectomized groups was mainly related to an increased fat mass. This increase has been widely associated with enhanced inflammation status and altered bone health, thus, one could speculate that BHC2000 may protect bone by lowering inflammation. In 3-month old female Sprague-Dawley OVX rats fed a cod gelatin diet for 90 days, Han and colleagues observed that the preserved femoral neck bone mineral density and trabecular microarchitectural properties was partly attributed to a significant reduction of pro-inflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6 and TNF- α) (2009). In addition, HC derived from chicken bones has been shown to reduce pro-inflammatory-cytokine production in mice (Zhang et al., 2010) and recent works support natural antioxidative properties of HC peptides (Alemán, Giménez, Pérez-Santin, Gómez-Guillén, & Montero, 2011; Ao & Li, 2012). However, in our hands HC showed no significant modification for the inflammatory parameters studied.

In contrast, circulating OPG and RANKL levels gave us a clue. Indeed, the level of RANKL was impacted by both, the ovariectomy, with a logical increase of the cytokine, and the BHC2000 diet, that was able to counteract this OVX-induced elevation of RANKL. Besides, although variation of OPG was not found significant, a trend was observed in the modulation of the RANKL/OPG ratio with a decrease in the BHC2000 group ($p = 0.07$). This observation echoes preliminary *in vitro* data (data not shown) demonstrating a decreased RANKL/OPG ratio when MC3T3-E1 were cultured in the presence of BHC2000. Taken together, these data strongly support a specific effect on osteoblast/osteoclast coupling that may account for bone loss prevention *in vivo*. To the best of our knowledge, this is the first time that such a modulation is reported in the literature.

Accordingly, using an original *ex vivo* approach taking into consideration hydrolyzed collagen metabolism at the whole body level, we demonstrated that serum enriched with BHC2000 metabolites was able to promote osteoblast proliferation and to stimulate mineralization activity while serum enriched with hydrolyzed casein metabolites (protein

control) was not. In parallel, the same plasma delayed osteoclastogenesis as demonstrated by videomicroscopy and transcriptomic analyses. This dual and opposite impact on both, osteoblast and osteoclast, provides a possible mechanism of action and rebounds on literature data. Positive effect of HC on human osteoblast proliferation, differentiation and mineralized bone matrix formation was recently reported in human as well as in murine cells (Kim, Kim, & Leem, 2013, 2014; Liu et al., 2014; Tsuruoka, Yamato, Sakai, Yoshitake, & Yonekura, 2007; Yamada, Nagaoka, et al., 2013; Yamada, Yoshizawa, et al., 2013). Regarding osteoclastogenesis, consistent with Guillerminet et al. who reported an inhibition of osteoclast formation and activity in cell lines and in primary cultures in the presence of bovine and porcine HC (Guillerminet et al., 2010), we observed that formation of giant multinucleated cells was significantly delayed in the presence of BHC2000 when compared to the hydrolyzed casein control. These data also parallel with a recent clinical study from Hooshmand et al. where osteopenic post-menopausal women were given 5 g of a calcium carbonate/collagen mix for 3 months. At the end of the protocol, treated women were found to have enhanced bone mass with an increased bALP (osteoblast marker of activity) /TRAP5b (osteoclast marker of activity) ratio in comparison to control volunteers (given 500 mg of calcium carbonate and 5 µg vitamin D daily) (Hooshmand et al., 2013).

Besides, the observed effect on bone was dependent on the presence of HC but not dependent on the presence of protein as revealed by the casein group, thus supporting a specific effect of HC. Subsequent to oral ingestion of HC in rodents and humans the major collagen-derived dipeptide found in plasma is Pro-Hyp (Ichikawa et al., 2010; Iwai et al., 2005; Shigemura et al., 2011). Interestingly, in Kawaguchi's work, when rats received [¹⁴C]Pro-Hyp orally, autoradiography revealed a noticeable cellular uptake of radioactivity in osteoblasts and osteoclasts as well as in dermal fibroblasts, epidermal cells, synovial cells and chondrocytes after 24 h (Kawaguchi, Nanbu, & Kurokawa, 2012). However, the effect of such an

accumulation of bioactive peptides in bone cells remains to be deciphered. Besides, interaction of the Asp-Gly-Glu-Ala amino acid domain of type I collagen with the $\alpha_2\beta_1$ integrin receptor on the cell membrane was proven to be an important signal for bone marrow cell differentiation towards an osteoblastic phenotype (Mizuno & Kuboki, 2001) and may contribute to partly explain results. It has been proposed that HC peptides are only digested to a certain degree within the gastrointestinal tract, with a proportion of intact high-molecular-weight proteins reaching the blood by passing through the enterocyte (transcytosis) at a level of approximately 10% (Moskowitz, 2000). Since HC from both fish and shrimp were described to contain both, a biologically related calcitonin and/or calcitonin-gene-related peptide (Fouchereau-Peron et al., 1999) this contribute to provide insights of the possible specific mechanisms of action of HC on bone.

From a global view point, our results not only correlate with literature data on the positive role of HC on bone but further prove that bone sparing properties of HC are not a mere protein effect, providing new explanations on the mode of action of HC action on bone through the modulation of the RANKL/OPG ratio and its subsequent impact on the osteoblast/osteoclast cell coupling. Therefore, according to our data and others from the literature, HC may stand as a relevant nutritional opportunity in the design of innovative strategies to manage bone health conditions.

References

- Alemán, A., Giménez, B., Pérez-Santin, E., Gómez-Guillén, M., & Montero, P. (2011). Contribution of Leu and Hyp residues to antioxidant and ACE-inhibitory activities of peptide sequences isolated from squid gelatin hydrolysate. *Food Chemistry*, 125(2), 334-341.
- Ao, J., & Li, B. (2012). Amino acid composition and antioxidant activities of hydrolysates and peptide fractions from porcine collagen. *Food Science and Technology International*, 18(5), 425-434.
- Bagchi, D., Misner, B., Bagchi, M., Kothari, S. C., Downs, B. W., Fafard, R. D., & Preuss, H. G. (2002). Effects of orally administered undenatured type II collagen against arthritic inflammatory diseases: a mechanistic exploration. [Clinical Trial Comparative Study]. *Int J Clin Pharmacol Res*, 22(3-4), 101-110.
- Bruyere, O., Rizzoli, R., Coxam, V., Avouac, B., Chevalier, T., Fabien-Soule, V., . . . Reginster, J. Y. (2012). Assessment of health claims in the field of bone: a view of the Group for the Respect of Ethics and Excellence in Science (GREES). *Osteoporos Int*, 23(1), 193-199. doi: 10.1007/s00198-011-1561-x
- Bruyere, O., Zegels, B., Leonori, L., Rabenda, V., Janssen, A., Bourges, C., & Reginster, J. Y. (2012). Effect of collagen hydrolysate in articular pain: a 6-month randomized, double-blind, placebo controlled study. [Multicenter Study Randomized Controlled Trial Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Complement Ther Med*, 20(3), 124-130. doi: 10.1016/j.ctim.2011.12.007
- Conference, C. D. (1993). Diagnosis, prophylaxis, and treatment of osteoporosis. [Consensus Development Conference Review]. *Am J Med*, 94(6), 646-650.
- Coxam, V., Davicco, M. J., & Demigne, C. (2008). Nutrition et métabolisme osseux. In Lavoisier (Ed.), *Aliments fonctionnels* (pp. 729-798).
- Currey, J. D. (2003). Role of collagen and other organics in the mechanical properties of bone. [Review]. *Osteoporos Int*, 14 Suppl 5, S29-36. doi: 10.1007/s00198-003-1470-8
- Elam, M. L., Johnson, S. A., Hooshmand, S., Feresin, R. G., Payton, M. E., Gu, J., & Arjmandi, B. H. (2014). A Calcium-Collagen Chelate Dietary Supplement Attenuates Bone Loss in Postmenopausal Women with Osteopenia: A Randomized Controlled Trial. *J Med Food*. doi: 10.1089/jmf.2014.0100
- Fouchereau-Peron, M., Duvail, L., Michel, C., Gildberg, A., Batista, I., & Le Gal, Y. (1999). Isolation of an acid fraction from a fish protein hydrolysate with a calcitonin-gene-related-peptide-like biological activity. *Biotechnol Appl Biochem*, 29(1), 87-92.
- Fujita, T., Ohue, M., Fujii, Y., Miyauchi, A., & Takagi, Y. (2002). The effect of active absorbable algal calcium (AAA Ca) with collagen and other matrix components on back and joint pain and skin impedance. [Clinical Trial]. *J Bone Miner Metab*, 20(5), 298-302. doi: 10.1007/s007740200043
- Guillermine, F., Beaupied, H., Fabien-Soule, V., Tome, D., Benhamou, C. L., Roux, C., & Blais, A. (2010). Hydrolyzed collagen improves bone metabolism and biomechanical parameters in ovariectomized mice: an in vitro and in vivo study. [Comparative Study]. *Bone*, 46(3), 827-834. doi: 10.1016/j.bone.2009.10.035
- Guillermine, F., Fabien-Soule, V., Even, P. C., Tome, D., Benhamou, C. L., Roux, C., & Blais, A. (2012). Hydrolyzed collagen improves bone status and prevents bone loss in

- ovariectomized C3H/HeN mice. *Osteoporos Int*, 23(7), 1909-1919. doi: 10.1007/s00198-011-1788-6
- Han, X., Xu, Y., Wang, J., Pei, X., Yang, R., Li, N., & Li, Y. (2009). Effects of cod bone gelatin on bone metabolism and bone microarchitecture in ovariectomized rats. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Bone*, 44(5), 942-947. doi: 10.1016/j.bone.2008.12.005
- Henrotin, Y., Lambert, C., Couchourel, D., Ripoll, C., & Chiotelli, E. (2011). Nutraceuticals: do they represent a new era in the management of osteoarthritis? - a narrative review from the lessons taken with five products. [Review]. *Osteoarthritis Cartilage*, 19(1), 1-21. doi: 10.1016/j.joca.2010.10.017
- Hooshmand, S., Elam, M. L., Browne, J., Campbell, S. C., Payton, M. E., Gu, J., & Arjmandi, B. H. (2013). Evidence for bone reversal properties of a calcium-collagen chelate, a novel dietary supplement. *Journal of Food & Nutritional Disorders*, 2, 1. doi: doi:10.4172/2324-9323.1000102
- Ichikawa, S., Morifuji, M., Ohara, H., Matsumoto, H., Takeuchi, Y., & Sato, K. (2010). Hydroxyproline-containing dipeptides and tripeptides quantified at high concentration in human blood after oral administration of gelatin hydrolysate. *Int J Food Sci Nutr*, 61(1), 52-60. doi: 10.3109/09637480903257711
- Iwai, K., Hasegawa, T., Taguchi, Y., Morimatsu, F., Sato, K., Nakamura, Y., . . . Ohtsuki, K. (2005). Identification of food-derived collagen peptides in human blood after oral ingestion of gelatin hydrolysates. *J Agric Food Chem*, 53(16), 6531-6536. doi: 10.1021/jf050206p
- Kawaguchi, T., Nanbu, P. N., & Kurokawa, M. (2012). Distribution of prolylhydroxyproline and its metabolites after oral administration in rats. *Biol Pharm Bull*, 35(3), 422-427.
- Kim, H. K., Kim, M. G., & Leem, K. H. (2013). Osteogenic activity of collagen peptide via ERK/MAPK pathway mediated boosting of collagen synthesis and its therapeutic efficacy in osteoporotic bone by back-scattered electron imaging and microarchitecture analysis. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Molecules*, 18(12), 15474-15489. doi: 10.3390/molecules181215474
- Kim, H. K., Kim, M. G., & Leem, K. H. (2014). Collagen hydrolysates increased osteogenic gene expressions via a MAPK signaling pathway in MG-63 human osteoblasts. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Food Funct*, 5(3), 573-578. doi: 10.1039/c3fo60509d
- Liu, J., Zhang, B., Song, S., Ma, M., Si, S., Wang, Y., . . . Guo, Y. (2014). Bovine collagen peptides compounds promote the proliferation and differentiation of MC3T3-E1 pre-osteoblasts. *PLoS One*, 9(6), e99920. doi: doi:10.1371/journal.pone.0099920
- Lotters, F. J., Lenoir-Wijnkoop, I., Fardellone, P., Rizzoli, R., Rocher, E., & Poley, M. J. (2013). Dairy foods and osteoporosis: an example of assessing the health-economic impact of food products. *Osteoporos Int*, 24(1), 139-150. doi: 10.1007/s00198-012-1998-6
- Mizuno, M., & Kuboki, Y. (2001). Osteoblast-related gene expression of bone marrow cells during the osteoblastic differentiation induced by type I collagen. *J Biochem*, 129(1), 133-138.
- Moskowitz, R. W. (2000). Role of collagen hydrolysate in bone and joint disease. [Clinical Trial Multicenter Study Randomized Controlled Trial]. *Semin Arthritis Rheum*, 30(2), 87-99. doi: 10.1053/sarh.2000.9622
- Nieves, J. (2013). Skeletal effects of nutrients and nutraceuticals, beyond calcium and vitamin D. *Osteoporosis International*, 24(3), 771-786.
- NIH. (2000). Osteoporosis prevention, diagnosis, and therapy. [Consensus Development Conference Consensus Development Conference, NIH Review]. *NIH Consens Statement*, 17(1), 1-45.

- Ricard-Blum, S. (2011). The collagen family. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 3(1), a004978. doi: 10.1101/cshperspect.a004978
- Shigemura, Y., Akaba, S., Kawashima, E., Park, E. Y., Nakamura, Y., & Sato, K. (2011). Identification of a novel food-derived collagen peptide, hydroxyprolyl-glycine, in human peripheral blood by pre-column derivatisation with phenyl isothiocyanate. *Food Chemistry*, 129(3), 1019-1024. doi: 10.1016/j.foodchem.2011.05.066
- Trc, T., & Bohmova, J. (2011). Efficacy and tolerance of enzymatic hydrolysed collagen (EHC) vs. glucosamine sulphate (GS) in the treatment of knee osteoarthritis (KOA). [Multicenter Study Randomized Controlled Trial]. *Int Orthop*, 35(3), 341-348. doi: 10.1007/s00264-010-1010-z
- Tsuruoka, N., Yamato, R., Sakai, Y., Yoshitake, Y., & Yonekura, H. (2007). Promotion by Collagen Tripeptide of Type I Collagen Gene Expression in Human Osteoblastic Cells and Fracture Healing of Rat Femur. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 71(11), 2680-2687. doi: 10.1271/bbb.70287
- Viguet-Carrin, S., Garnero, P., & Delmas, P. D. (2006). The role of collagen in bone strength. [Review]. *Osteoporos Int*, 17(3), 319-336. doi: 10.1007/s00198-005-2035-9
- Yamada, S., Nagaoka, H., Terajima, M., Tsuda, N., Hayashi, Y., & Yamauchi, M. (2013). Effects of fish collagen peptides on collagen post-translational modifications and mineralization in an osteoblastic cell culture system. [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Dent Mater J*, 32(1), 88-95.
- Yamada, S., Yoshizawa, Y., Kawakubo, A., Ikeda, T., Yanagiguchi, K., & Hayashi, Y. (2013). Early gene and protein expression associated with osteoblast differentiation in response to fish collagen peptides powder. [Comparative Study]. *Dent Mater J*, 32(2), 233-240.
- Zhang, Y., Kouguchi, T., Shimizu, K., Sato, M., Takahata, Y., & Morimatsu, F. (2010). Chicken collagen hydrolysate reduces proinflammatory cytokine production in C57BL/6. KOR-ApoEshl mice. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*, 56(3), 208-210.

Legends

Figure 1. Osteoblast proliferation and early and late differentiation.

(A) Cell proliferation test performed on MC3T3-E1 cells cultured in medium alone or supplemented either with BSA or bovine hydrolyzed collagen (BHC 2000Da at 0.5 mg/ml) after 7 days of culture. (B) Alkaline Phosphatase activity on MC3T3-E1 cells cultured in medium alone or supplemented either with BSA or bovine hydrolyzed collagen (0.5 mg/ml) after 3 and 7 days of culture. Results are expressed as mean±SD. * $p<0.05$ vs. CTRL- condition. (C) Mineralized nodules stained with Alizarin red S on day 21 in MC3T3-E1 cells cultured in the presence of BSA or bovine hydrolyzed collagen (0.5 mg/ml).

Figure 2. Validation of ovariectomy and analysis of bone mineral density

(A) Uterus weight. (B) BMD analysis of left femur by X-ray radiation micro-CT. Sham versus OVX (ovariectomized mice) – Percentage of dietary casein content (15 and 17.5%). BHC 2000 (Bovine hydrolyzed collagen 2000 Da). Results are presented as mean±SD (n=10). Groups with different letters are significantly different ($p<0.05$).

Figure 3. Effect of ovariectomy and diet on food intake and body composition.

(A) Daily food intake. (B) Body weight. (C) Total lean mass. (D) Total fat mass. (E) Fat mass gain. Results are presented as mean±SD (n=10). Groups with different letters are significantly different ($p<0.05$).- Sham versus OVX (ovariectomized mice) – Percentage of casein content (15 and 17.5%).- BHC 2000 (Bovine hydrolyzed collagen 2000 Da).

Figure 4. Effect of ovariectomy and diet on inflammation and bone remodeling parameters.

(A) Spleen weight. (B) MCP1 serum level. (C and D) PINP and CTX-1 serum levels. (E and F) RANKL and OPG serum levels. Results are presented as mean $\pm$ SD (n=10). *p<0.05 - Sham versus OVX (ovariectomized mice) – Percentage of casein content (15 and 17.5%).- BHC 2000 (Bovine hydrolyzed collagen 2000 Da).

Figure 5. Bovine hydrolyzed collagen absorption profile.

Mice were force-fed with a 50% hydrolyzed collagen solution (Bovine hydrolyzed collagen 2000 Da). Serum collection was performed at 0h, 0.5h, 1h, 2h, 3h, 6h, 9h and 24 hours after administration to determine the maximum absorption peak.

Figure 6. Effect of metabolite-enriched serum on osteoblast behavior.

(A) XTT proliferation assay performed at day 1, 2 and 7 on MC3T3-E1 cell line cultured in fetal calf serum (FCS) 0%, 2% or with 2% serum from mice exposed either to physiological serum (CTRL), hydrolyzed casein (CASEIN) or hydrolyzed collagen (BHC 2000). Results are expressed as mean $\pm$ SD. Groups with different letters are significantly different (p<0.05). (B and C) Mineralized nodules stained with Alizarin red S on day 21 in MC3T3-E1 cultured in α MEM medium with 10% FCS or with 7.5% FCS + 2.5% serum from mice exposed either to physiological serum (CTRL), hydrolyzed casein (CASEIN) or hydrolyzed collagen (BHC 2000). Results are expressed as mean $\pm$ SD. Groups with different letters are significantly different (p<0.05).

Figure 7. Effect of BHC 2000 enriched serum on osteoclast activity.

(A) XTT osteoclast proliferation assay performed after 7 days on RAW264.7 cells cultured either with 2% FCS or with 2% of serum from mice exposed either to physiological serum (CTRL), hydrolyzed casein (CASEIN) or hydrolyzed collagen (BHC 2000). Results are expressed as mean $\pm$ SD. Groups with different letters are significantly different (p<0.05). (B)

Videomicroscopy of RAW264.7 cells cultured in the presence of RANKL (25ng/ml) either with 2% FCS or with 2% of serum from mice exposed either to physiological serum (CTRL), hydrolyzed casein (CASEIN) or hydrolyzed collagen (BHC 2000). Pictures showed are representative of the experiment (see supplemental data for full video). Red lines represent multi-nucleated cell contours.

Table 1: Composition of the diets (%)

Ingredients (%)	Control 15%	Control 17.5%	BHC 2000
Casein	15	17,5	15
Sucrose	10	10	10
Dextrine	15,5	15,5	15,5
Cellulose	5	5	5
Saturated fat	2	2	2
Sunflower oil	2	2	2
Rape oil	3	3	3
BHC 2000			2,5
L-cystine	0,18	0,18	0,18
Choline bitartrate	0,25	0,25	0,25
Mineral mix (AIN-93M-MX)	3,5	3,5	3,5
Vitamin mix (AIN-93-VX)	1	1	1
Corn starch	42,57	40,07	40,07
%	100	100	100

Figure 1

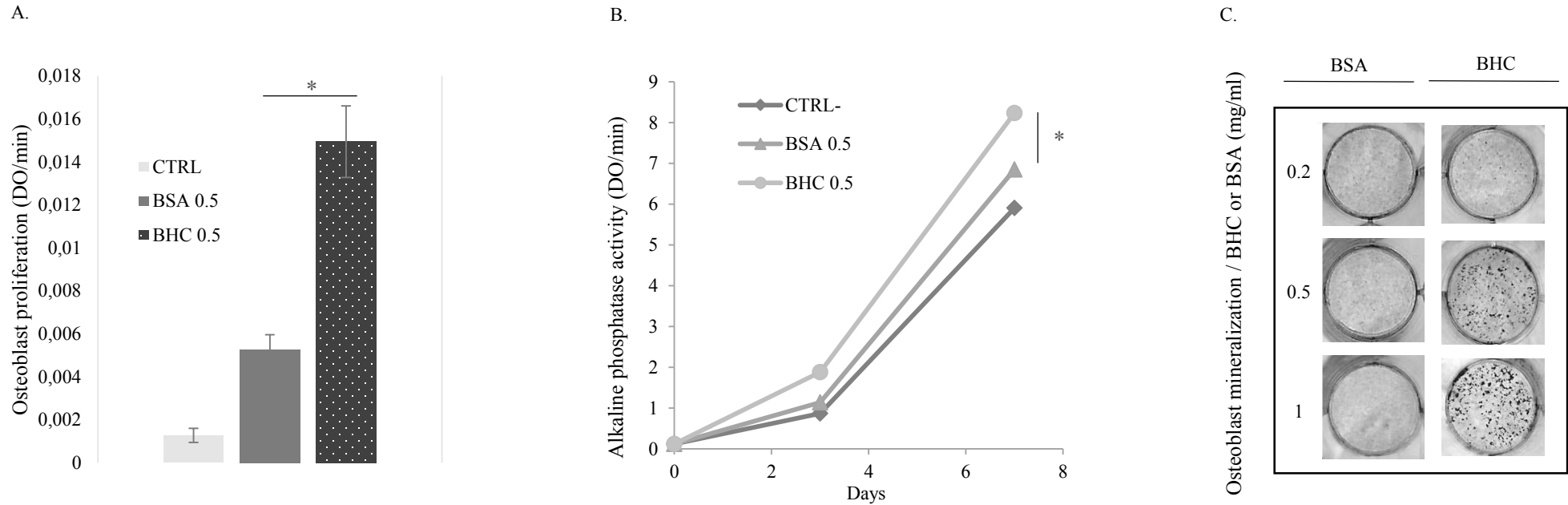


Figure 2

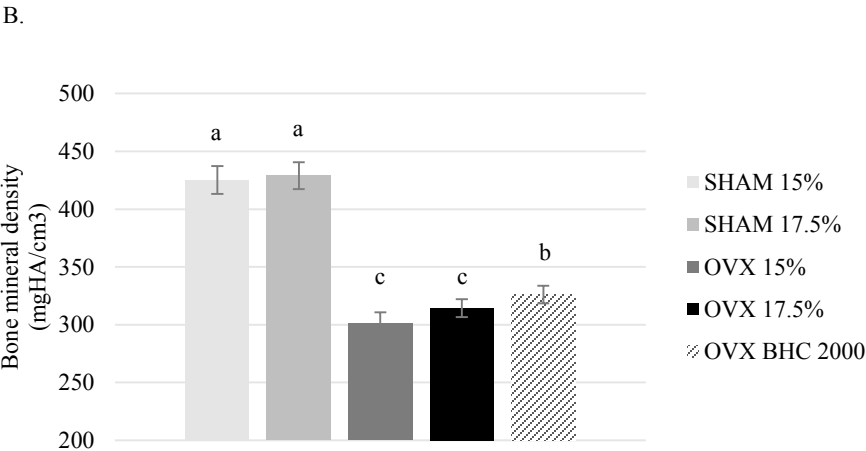
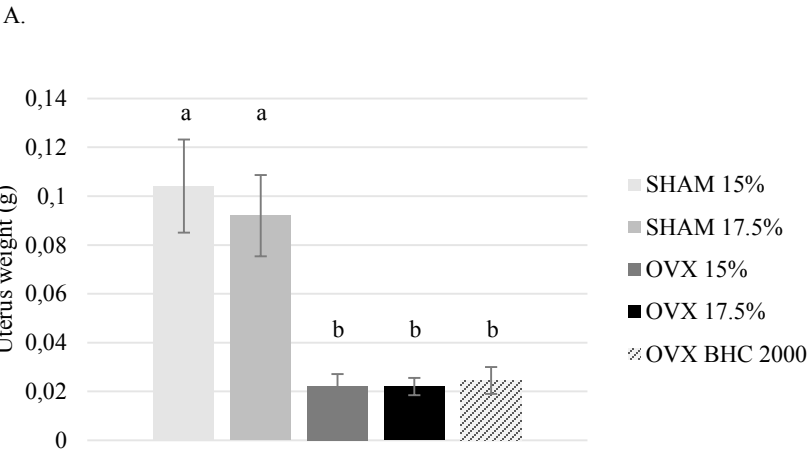


Figure 3

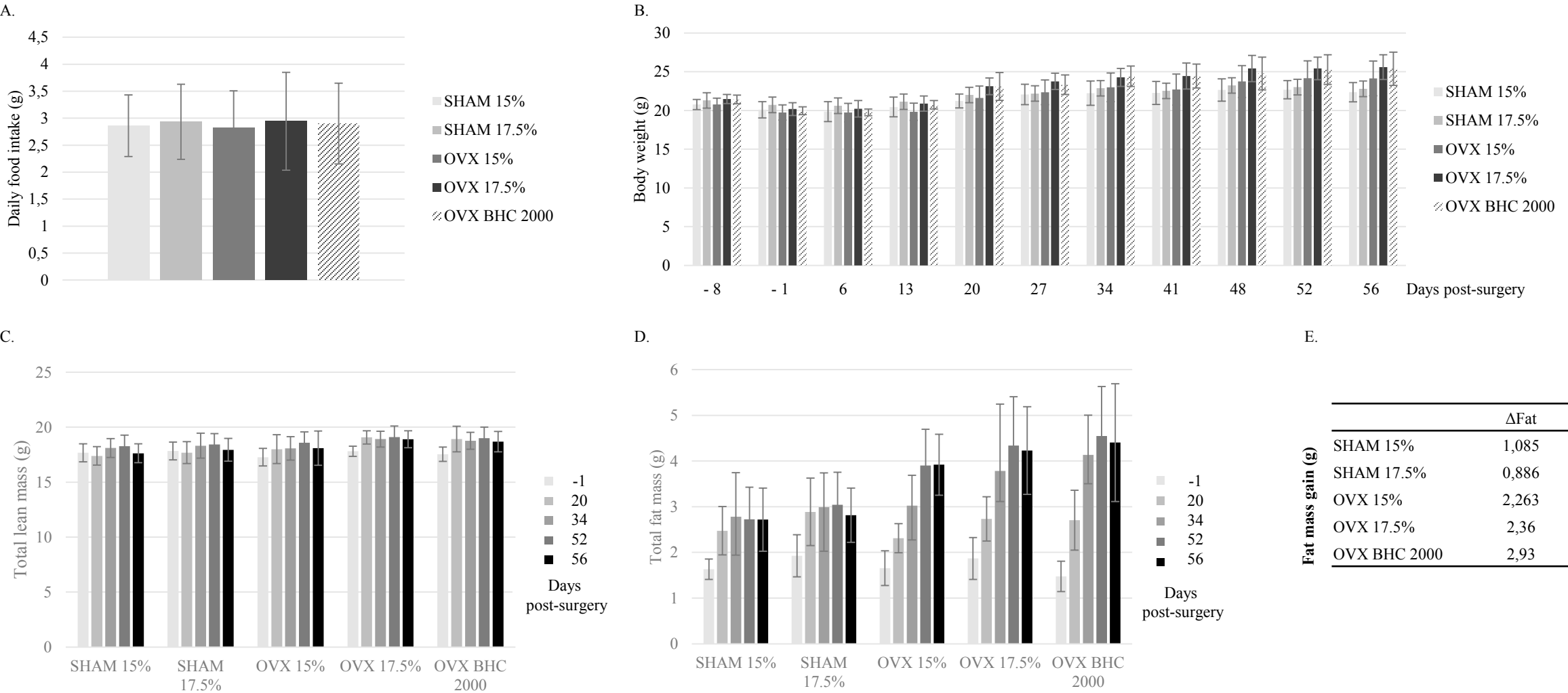
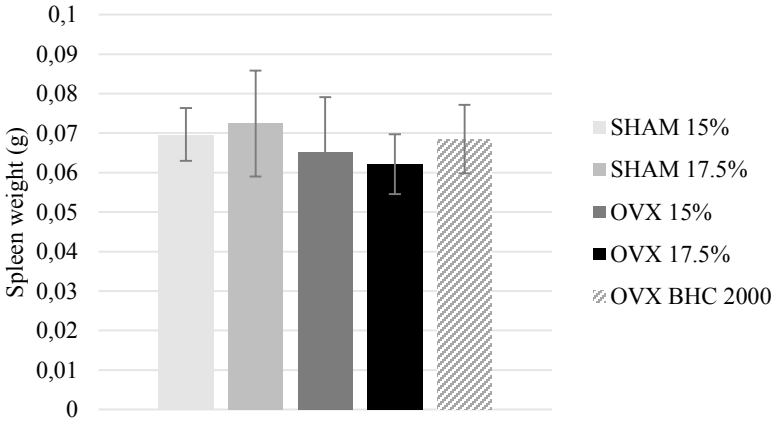
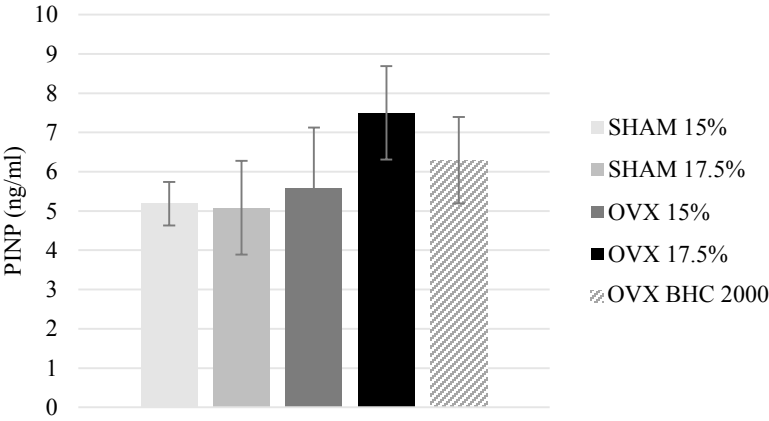


Figure 4

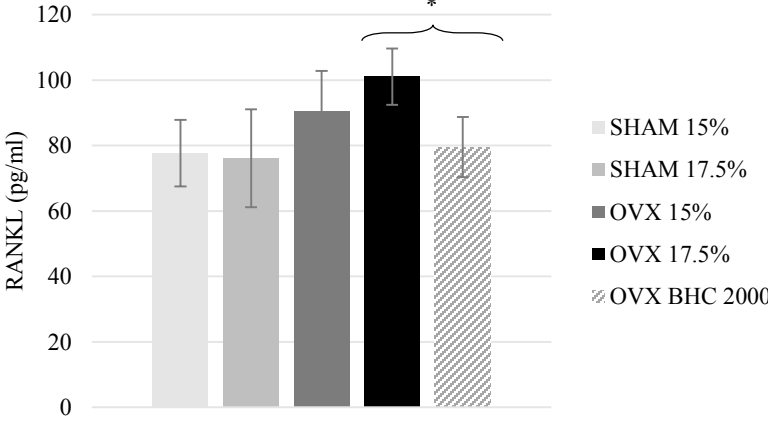
A.



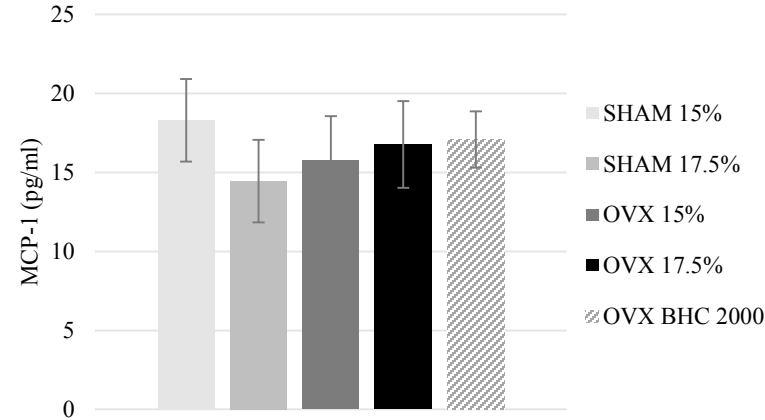
C.



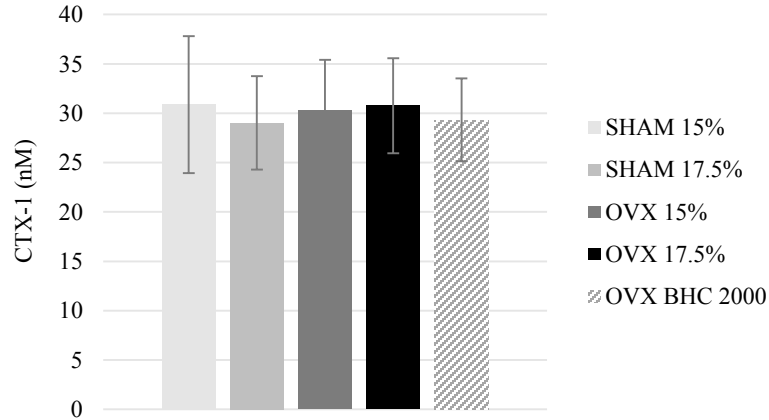
E.



B.



D.



F.

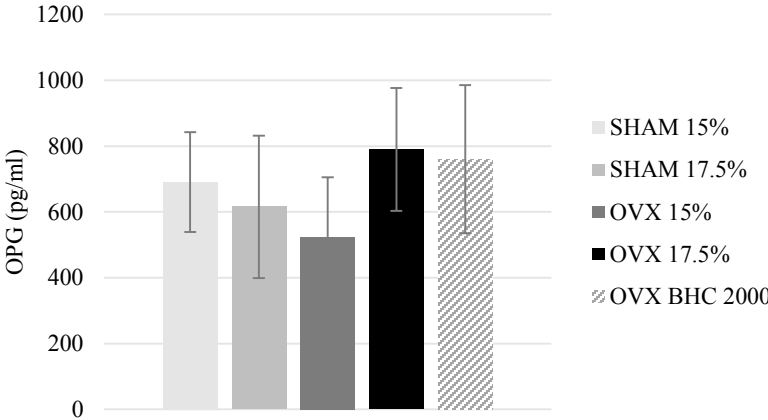


Figure 5

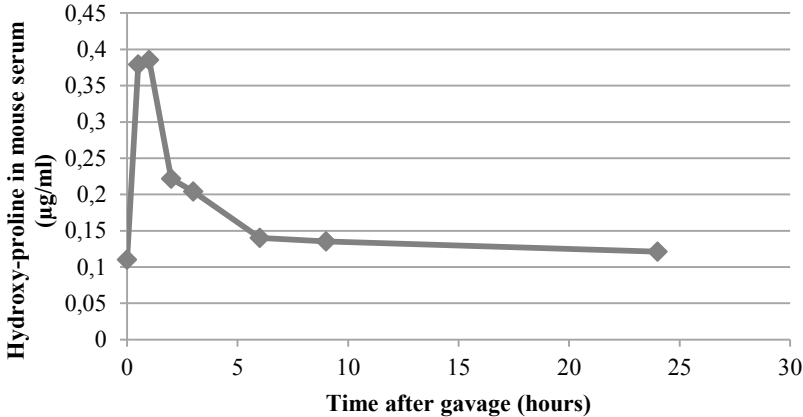


Figure 6

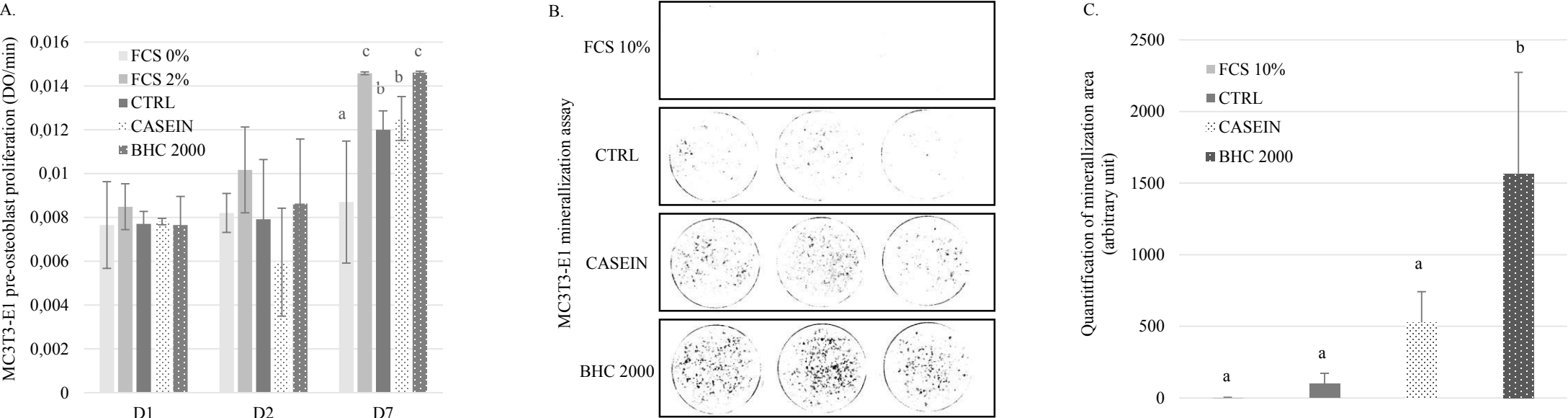


Figure 7

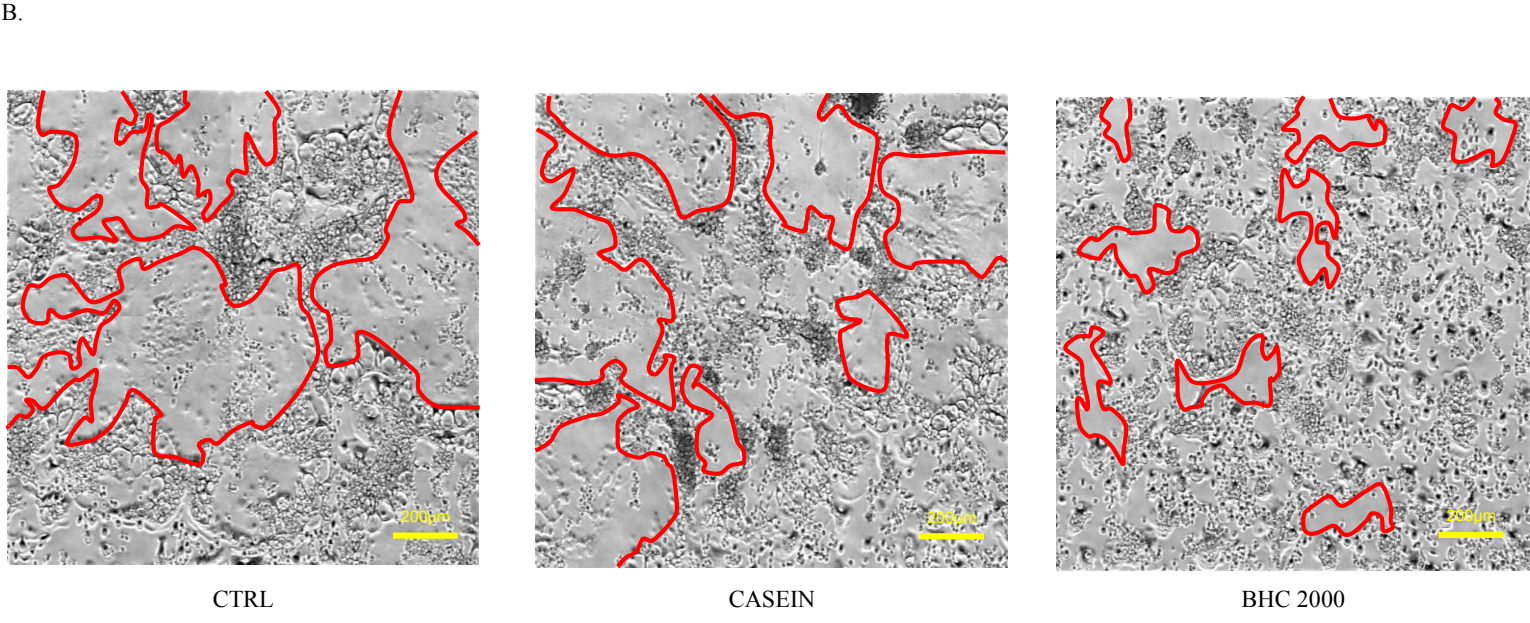
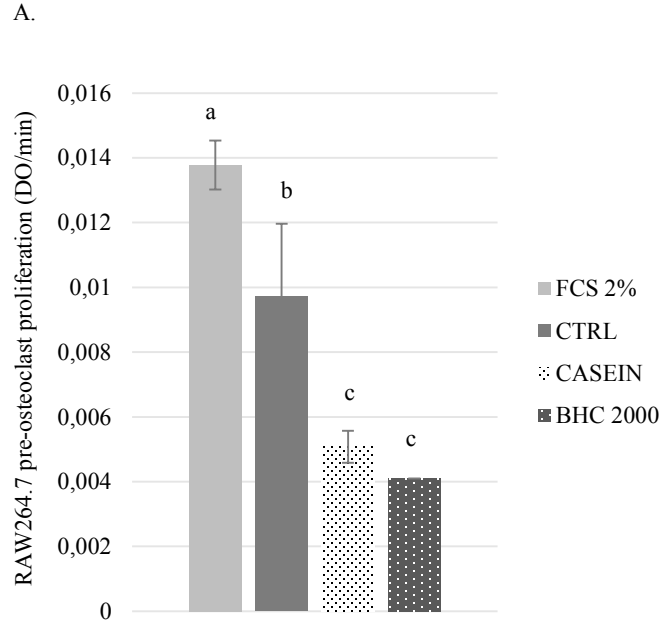


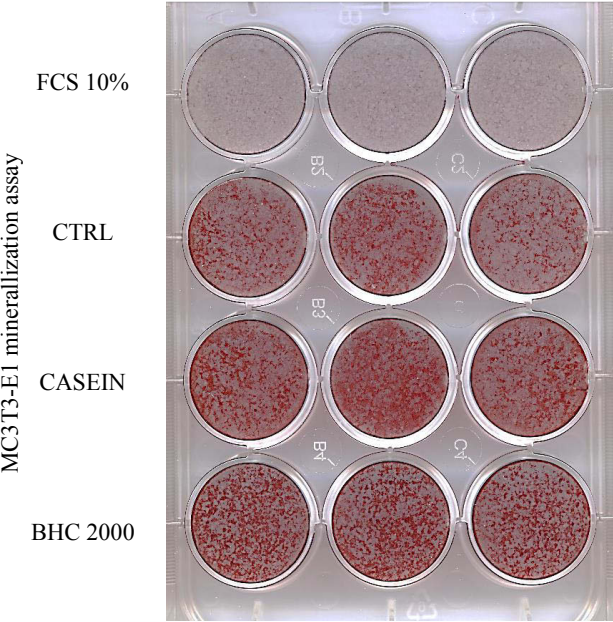
Table 2. Taqman Low Density Array on differentiated RAW264.7 cells

	CTRL (RQ)	CASEIN (RQ)	CASEIN (p-value)	BHC 2000 (RQ)	BHC 2000 (p-value)
Acp5	1.0	0.5399	0.5466	0.4501	0.0323
Car2	1.0	0.5213	0.3226	0.5246	0.0282
Csf1r	1.0	0.5794	0.0321	0.7832	0.0279
Ctsk	1.0	0.6977	0.7272	0.75	0.0606
Itgb3	1.0	0.4719	0.3913	0.5384	0.0644
Mmp9	1.0	0.5523	0.5636	0.6314	0.0832
Nos2	1.0	0.4786	0.1535	0.2427	0.0672
Tgfbr1	1.0	0.4351	0.3773	0.3422	0.0608
Tnfrsf1b	1.0	0.5886	0.1745	0.4954	0.0716
Traf2	1.0	0.5696	0.1258	0.6985	0.067
Traf6	1.0	0.6058	0.0523	0.647	0.045

Table 3. Taqman Low Density Array on bone marrow cells

	Cas (rq)	Coll (rq)	Coll (p-value)
Cd36	1.0	0.6618	0.042
Itgam	1.0	0.8607	0.0689
Tlr2	1.0	0.8193	0.0676
Tnfrsf1b	1.0	0.7766	0.0326

Supplemental data: alizarin staining from figure 6





DISCUSSION ET CONCLUSION

Discussion Générale

Ce travail avait pour objectif principal d'étudier la relevance de l'utilisation du HC dans la mise au point de stratégies nutritionnelle pour la prévention de l'ostéoporose en posant les questions : comment cela fonctionne-t-il et existe-t-il des moyens d'optimisation des effets biologiques ?

Pour répondre à ces questions, plusieurs tâches ont été définies avec pour objectif de déterminer (1) l'importance de l'origine des HC, (2) l'importance de leur degrés d'hydrolyse et (3) le rôle des métabolites des HC sur l'activité des cellules osseuses.

Notre étude a permis de démontrer que :

- le collagène hydrolysé d'origine bovine (BHC) contribue à limiter la perte osseuse induite par l'ovariectomie
- la limitation de la perte osseuse induite est liée à un effet spécifique du BHC
- la préservation de la masse osseuse est dépendante de la longueur du peptide
- le BHC favorise la survie et la différenciation ostéoblastique et inversement pour les ostéoclastes
- le BHC module le ratio OPG / RANKL

L'étude du potentiel du collagène hydrolysé sur la santé osseuse a véritablement pris son essor ces quinze dernières années, et plusieurs questions de recherche ont permis de définir l'intérêt de cette investigation (Adam, Spacek, Hulejova, Galianova, & Blahos, 1996; De Almeida Jackix et al., 2010; Fu & Zhao, 2013; Guillerminet et al., 2010; Guillerminet et al., 2012; Han et al., 2009; J. Liu et al., 2014; Nomura, Oohashi, Watanabe, & Kasugai, 2005; Takeda et al., 2013; Tsuruoka et al., 2007; Uehara, Takahashi, Watanabe, & Nomura, 2014; Wu, Fujioka, Sugimoto, Mu, & Ishimi, 2004; Xu et al., 2010). Néanmoins, c'est la première fois qu'une étude s'intéresse au rôle des métabolites du collagène hydrolysé et à leur mode d'action sur les cellules osseuses. Nous avons essayé de poser les bonnes questions et d'apporter les meilleures réponses. Nous allons essayer dans les paragraphes suivants de critiquer notre questionnement.

Etudes in vitro : Collagène hydrolysé et pré-ostéoblastes murins ?

Pour déterminer préalablement l'impact des hydrolysats de collagène sur l'activité des ostéoblastes, nous avons utilisé la lignée de pré-ostéoblastes murins MC3T3-E1. Nos résultats suggèrent que parmi les différents collagènes testés (bœuf, porc et poisson), seul le collagène hydrolysé bovin permet d'augmenter sensiblement l'activité de la phosphatase alcaline (ALP), marqueur précoce de différenciation ostéoblastique. Ces résultats sont en accord avec les données de la littérature. En effet, les peptides de collagène augmentent l'activité ALP dans des cultures de cellules humaines MG-63 (H. K. Kim, Kim, & Leem, 2013, 2014), des cultures primaires (Guillerminet et al., 2010) ou d'ostéosarcome NOS-1 (Yamada, Yoshizawa, et al., 2013). Néanmoins, l'utilisation directe de nutriments sur des cultures cellulaires est largement critiquable dans la mesure où l'influence de la barrière intestinale n'est pas prise en compte. Ainsi, malgré les résultats in vitro en faveur du BHC, l'expérimentation in vivo s'est effectuée sur l'ensemble des collagènes hydrolysés à tester.

Quel est l'influence in vivo des fractions de collagène hydrolysé à l'échelle de l'organisme ?

Choix du modèle in vivo

Nous avons choisi d'utiliser un modèle de souris ovariectomisée. L'ovariectomie conduit à une carence oestrogénique qui entraîne une perte osseuse dont le tableau chez la souris est très proche de l'ostéoporose post-ménopausique diagnostiquée en clinique (Kafantari, Kounadi, Fatouros, Milonakis, & Tzaphlidou, 2000). Le choix de ce modèle a été renforcé par la volonté d'utiliser le même modèle de perte osseuse et la même souche de souris que nos collègues parisiens Guillerminet et al. (2010). Néanmoins, si la cible clinique (ostéoporose post-ménopausique) est pertinente au regard du marché des compléments alimentaires, on peut se demander si le modèle est pertinent au regard de l'efficacité nutritionnelle (Figure 30). En effet, l'impact observé *in vivo* reste faible et le questionnement du choix du modèle s'impose. Dans ce contexte, il serait raisonnable d'envisager une supplémentation à plus long terme sur un modèle d'ostéoporose sénile afin de déterminer si l'efficacité de cette approche ne serait pas plus adaptée à une perte osseuse dont la pente d'établissement est plus faible. Ceci étant, l'ostéoporose post-ménopausique, à la différence de l'ostéoporose sénile, est caractérisée par une forte composante ostéoclastique et les résultats sur l'inhibition de l'ostéoclastogénèse obtenus avec les sérums enrichis sont de nature à soutenir les investigations engagées.



Figure 30 : Comparaison d'images de fémurs. (i) Fémur de souris C3H/HeN SHAM-operated ; (ii) Fémur de souris C3H/HeN ovariectomisée ; (iii) Fémur de souris C57BL/6J ovariectomisée

Choix du régime

Les recommandations actuelles au Japon pour l'ingestion de collagène hydrolysé sont situées entre 1 et 10g par jour (Wu et al., 2004) et plusieurs études cliniques portent sur des femmes recevant 10g/ jour (Adam et al., 1996; Cuneo et al., 2010). L'apport quotidien recommandé de protéine varie entre 0,8 et 1g/kg de poids chez l'homme. Soit pour une femme de 60kg : entre 50g et 60g de protéines. 10g de collagène hydrolysé représentent donc plus de 15% de l'apport quotidien en protéine. Pour notre étude nous avons suivi ces recommandations que nous avons appliquées aux souris. Chez la souris la ration journalière en protéines recommandée est de l'ordre de 15%. Nous avons utilisé un régime à 17,5 pour nous placer en supplémentation. Les 2,5% de collagène hydrolysé représentent donc 15% de l'apport protéique total conformément à la supplémentation chez l'homme. Ce régime a été fourni pendant 8 semaines. Cela correspondrait chez l'homme à une supplémentation pendant 5 à 6 années. Ces différents aspects distinguent cette étude de celles de Guillerminet et peuvent en partie expliquer la différence de résultat même si nos conclusions se font écho.

Quel est la pertinence de l'utilisation des métabolites de collagène hydrolysé sur les cellules osseuses ?

Les données de la littérature montrent que le collagène hydrolysé est utilisé directement sur les cellules osseuses sans tenir compte de la barrière intestinale. L'originalité de notre étude est que nous avons utilisé une approche ex vivo en tenant compte du métabolisme du collagène hydrolysé. Nous avons démontré que le sérum enrichi en métabolites du BHC2000 favorisait la viabilité et l'activité de minéralisation des cellules ostéoblastiques alors que le sérum enrichi en métabolite de caséine (contrôle protéique) ne le permettait pas, soulignant ainsi un effet spécifique et

non-protéique. En parallèle, ce même sérum retardait l'ostéoclastogénèse dans des cultures de RAW264.7 poussées vers la différenciation par l'addition de RANKL. Ce double impact nous fournit un début d'explication sur le possible mécanisme d'action mis en jeu au niveau tissulaire et concorde avec les données de la littérature. Un effet positif du HC sur la différenciation ostéoblastique et la formation de nodules minéralisés a été récemment rapporté sur des cultures de cellules humaines ou murines (H. K. Kim et al., 2013, 2014; J. Liu et al., 2014; Yamada, Nagaoka, et al., 2013; Yamada, Yoshizawa, et al., 2013). En ce qui concerne les ostéoclastes, nous avons obtenu des données comparables avec celles de Guillerminet et al. (2010) qui fait état d'une inhibition de la formation et de l'activité des ostéoclastes dans des cultures primaires, en présence de HC d'origine bovine et porcine.

Pourquoi, l'étude des métabolites est-elle plus pertinente ?

- (1) À la suite de l'ingestion de HC chez les rongeurs et les humains le dipeptide majeur dérivé du collagène trouvé dans le plasma est le peptide Pro-Hyp (Ichikawa et al., 2010; Iwai et al., 2005; Shigemura et al., 2011) et lorsque celui-ci est marqué, l'autoradiographie révèle une absorption cellulaire notable de la radioactivité dans les ostéoblastes et les ostéoclastes, ainsi que dans les fibroblastes dermiques, cellules épidermiques, les cellules synoviales et les chondrocytes après 24 h (Kawaguchi, Nanbu, & Kurokawa, 2012). Toutefois, la proportion et l'effet d'une telle accumulation de peptides bioactifs dans les cellules osseuses reste à déchiffrer.
- (2) L'interaction entre le peptide Asp-Gly-Glu-Ala du collagène de type I et l'intégrine $\alpha 2 \beta 1$ située sur la membrane des cellules osseuses stimule la différenciation des cellules de la moelle osseuse vers un phénotype ostéoblastique (Mizuno & Kuboki, 2001) et contribue à la pertinence de l'approche.

Conclusion Générale

Après avoir discuté la pertinence des approches conceptuelles et méthodologiques, qu'en est-il vraiment de l'intérêt du candidat « collagène hydrolysé » dans la démarche nutrition santé. D'un point de vue global, nos résultats confirment le potentiel du collagène hydrolysé dans la prise de l'ostéopénie à minima. Ce travail fournit en complément de nouvelles perspectives sur l'importance de l'origine et du processus d'obtention du collagène hydrolysé, sur la spécificité d'effet et le mode d'action (modulation du rapport RANKL / OPG et impact sur le couplage des ostéoblastes et d'ostéoclastes). En conséquence, ces résultats soutiennent l'intérêt du collagène hydrolysé dans la conception de stratégies novatrices pour le management des troubles ostéoporotiques.

Deux aspects sont à creuser. Le premier est mécanique. Considérant le tissu osseux comme un élément de l'appareil locomoteur au même titre que le muscle ou l'articulation, le collagène hydrolysé peut-il avoir un effet sur ces tissus et contribuer à prévenir les troubles de l'appareil locomoteur et à préserver la mobilité chez la personne en vieillissement pour retarder l'entrée en dépendance, garantir l'autonomie, la qualité de vie de l'individu et ainsi réduire l'écart qui se creuse entre durée de vie et durée de vie en « bonne santé ».

Quid de l'impact du collagène hydrolysé sur la prévention de la sarcopénie ?

Avec l'âge, l'individu présente un risque accru de dénutrition protéino-énergétique, préfigurant l'installation d'un tableau sarcopénique associé à des complications métaboliques et une altération de la qualité de vie (Symons, Sheffield-Moore, Wolfe, & Paddon-Jones, 2009). A l'image de l'ostéoporose, la sarcopénie se caractérise par une perte de la masse et de la fonctionnalité musculaire. La personne âgée présente fréquemment une déficience de l'apport protéique quotidien alors que, paradoxalement, leurs besoins en protéines sont supérieurs aux Apports Nutritionnels Conseillés pour un adulte. Le collagène hydrolysé pourrait donc présenter un intérêt majeur pour un apport supplémentaire en protéines surtout si celui-ci est pourvu d'effets spécifiques sur la stimulation de l'anabolisme ou la diminution du catabolisme musculaire.

Une étude assez ancienne a montré qu'au cours d'un régime hypocalorique, lorsque les individus obèses recevaient un apport protéique exclusivement composé de collagène hydrolysé, ceux-ci présentaient une meilleure balance azotée en comparaison du groupe d'individus ayant reçu le lactosérum seul (Gougeon, Hoffer, Pencharz, & Marliss, 1992). Cette avantage a plus récemment été complété, démontrant le potentiel du collagène hydrolysé pour prévenir un bilan azoté négatif et minimiser la morbidité et la mortalité dans les populations âgées vulnérables (Hays, Kim, Wells, Kajkenova, & Evans, 2009). Parallèlement, le collagène hydrolysé pourrait avoir un effet bénéfique sur l'activité physique et donc le maintien de la capacité à se mouvoir des personnes âgées. En effet, il est rapporté dans un modèle murin de vieillissement que le collagène hydrolysé issu de méduses présente un effet antioxydant et diminue la fatigue après un exercice physique (Ding et al., 2011).

Quid de l'impact du collagène hydrolysé sur l'arthrose ?

L'arthrose est une maladie dégénérative du cartilage articulaire et représente l'une des causes principales d'invalidité. Le cartilage articulaire est essentiellement composé d'eau (70 à 80 % du poids humide), de protéoglycanes (PG) et de collagène. Les cellules ne représentent qu'environ 1 % du volume du cartilage articulaire (Vignon, 2000). Le collagène contenu dans le cartilage est essentiellement du collagène de type II ($\geq 90\%$). On retrouve aussi du collagène de type IX (1%) et XI (3%) (Eyre, 2002).

Plusieurs études cliniques ont démontré l'effet bénéfique de l'ingestion de collagène (de type II, hydrolysé ou non, pris seul ou en complément de chondroïtine sulfate ou d'acide hyaluronique) sur l'amélioration de la qualité de vie de patients souffrant d'arthrose avec une amélioration de la douleur ressentie (Bagchi et al., 2002; Schauss, Merkel, Glaza, & Sorenson, 2007; Trc & Bohmova, 2011). En 1999, le groupe d'Oesser a démontré qu'après ingestion le collagène hydrolysé radiomarké passait la barrière intestinale pour s'accumuler dans le cartilage de souris C57BL/6. In vitro, le collagène hydrolysé stimule la synthèse de PG et d'aggrécane dans la matrice extracellulaire par les chondrocytes primaires de porc et des chondrocytes fémoraux humain (Schulze & Oesser, 2007).

En parallèle, le collagène hydrolysé pourrait agir de concert avec des polyphénols de thé vert pour protéger le chondrocyte contre les effets délétères d'un environnement pro-inflammatoire (Comblain et al., 2015). Néanmoins, les preuves actuelles restent insuffisantes pour recommander une utilisation journalière du HC et d'autres études sont nécessaires pour confirmer l'intérêt clinique de ce complément alimentaire (Bruyere et al., 2012; Van Vlijven et al., 2012) estimant que des études indépendantes et de meilleures qualités sont nécessaires pour confirmer les effets thérapeutiques de dérivés de collagène sur l'arthrose.

Effet métabolique sur la moelle osseuse

La moelle osseuse renferme des niches de cellules souches hématopoïétiques et mésenchymateuses. Ces dernières ont la capacité de se différencier en adipocytes, fibroblastes, chondroblastes ou ostéoblastes. Cette capacité peut être orientée, ainsi l'interaction entre l'intégrine $\alpha 2 \beta 1$ et le collagène de la matrice extracellulaire joue un rôle crucial dans leur différenciation vers un phénotype ostéoblastique.

Mizuno a démontré que lorsque des cellules de la moelle osseuse étaient cultivées sur une matrice de collagène de type I, forte augmentation de l'activité phosphatase alcaline était observée accompagnée d'une synthèse accrue de protéines matricielles telles que le collagène de type I, l'ostéocalcine, l'ostéopontine et la sialoprotéine osseuse (Mizuno, Fujisawa, & Kuboki, 2000). En 2004, l'équipe de Salaszyk a obtenu des résultats similaires, à savoir que : une matrice de collagène de type I est suffisante pour favoriser la différenciation ostéogénique des cellules mésenchymateuses en l'absence d'inducteurs ostéogéniques (Roman M Salaszyk, Williams, Boskey, Batorsky, & Plopper, 2004).

Que se passe-t-il lorsque le collagène est hydrolysé et non utilisé comme matrice de revêtement ?

Il existe très peu de données concernant l'effet du HC sur les cellules souches osseuses. Récemment, (C. Liu & Sun, 2014) ont testé l'influence du collagène hydrolysé de poisson sur la viabilité et sur la différenciation de cellules mésenchymateuses de la moelle osseuse. Ils ont montré qu'à une concentration de 0,2 mg/ml, le HC favorise l'expression de marqueurs ostéogéniques tels que la phosphatase alcaline, l'ostéopontine et l'ostéocalcine en activant les voies MAPK/ERK et RUNX2. De façon intéressante, Liu ont constaté que le HC inhibait la différenciation chondrocytaire et adipocytaire. Ces résultats sont cohérents avec l'ensemble des données de la littérature, toutefois, ces investigations restent à approfondir.

Lors de cette thèse une approche mécanistique ciblant la signalisation cellulaire dépendante des intégrines et les « points d'adhésion focaux » était prévue. Faute de temps cette investigation n'a pas pu se faire. Néanmoins, compte tenu des résultats obtenus avec cette approche ex vivo originale, une large page de la détermination des modes d'action du collagène hydrolysé sur l'activité des cellules osseuse reste à écrire.



REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Adam, M., Spacek, P., Hulejova, H., Galianova, A., & Blahos, J. (1996). [Postmenopausal osteoporosis. Treatment with calcitonin and a diet rich in collagen proteins]. *Cas Lek Cesk*, 135(3), 74-78.
- Aguda, A. H., Panwar, P., Du, X., Nguyen, N. T., Brayer, G. D., & Bromme, D. (2014). Structural basis of collagen fiber degradation by cathepsin K. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111(49), 17474-17479. doi: 10.1073/pnas.1414126111
- Aito-Inoue, M., Lackeyram, D., Fan, M. Z., Sato, K., & Mine, Y. (2007). Transport of a tripeptide, Gly-Pro-Hyp, across the porcine intestinal brush-border membrane. *J Pept Sci*, 13(7), 468-474. doi: 10.1002/psc.870
- Bagchi, D., Misner, B., Bagchi, M., Kothari, S. C., Downs, B. W., Fafard, R. D., & Preuss, H. G. (2002). Effects of orally administered undenatured type II collagen against arthritic inflammatory diseases: a mechanistic exploration. *Int J Clin Pharmacol Res*, 22(3-4), 101-110.
- Baron, R., & Hesse, E. (2012). Update on bone anabolics in osteoporosis treatment: rationale, current status, and perspectives. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 92(2), 311-325.
- Baron, R., & Kneissel, M. (2013). WNT signaling in bone homeostasis and disease: from human mutations to treatments. *Nat Med*, 19(2), 179-192. doi: 10.1038/nm.3074
- Barrett-Connor, E., Mosca, L., Collins, P., Geiger, M. J., Grady, D., Kornitzer, M., . . . Wenger, N. K. (2006). Effects of raloxifene on cardiovascular events and breast cancer in postmenopausal women. *N Engl J Med*, 355(2), 125-137. doi: 10.1056/NEJMoa062462
- Biver, E., Chopin, F., Coiffier, G., Brentano, T. F., Bouvard, B., Garnero, P., & Cortet, B. (2012). Bone turnover markers for osteoporotic status assessment? A systematic review of their diagnosis value at baseline in osteoporosis. *Joint Bone Spine*, 79(1), 20-25.
- Black, R. E., Williams, S. M., Jones, I. E., & Goulding, A. (2002). Children who avoid drinking cow milk have low dietary calcium intakes and poor bone health. *Am J Clin Nutr*, 76(3), 675-680.
- Blake, G. M., & Fogelman, I. (1997). *Technical principles of dual energy x-ray absorptiometry*. Paper presented at the Seminars in Nuclear Medicine.
- Blake, G. M., & Fogelman, I. (2010). An Update on Dual-Energy X-Ray Absorptiometry. *Seminars in Nuclear Medicine*, 40(1), 62-73. doi: <http://dx.doi.org/10.1053/j.semnuclmed.2009.08.001>
- Boling, E. P. (2004). Secondary osteoporosis: underlying disease and the risk for glucocorticoid-induced osteoporosis. *Clin Ther*, 26(1), 1-14.
- Bonjour, J.-P., Chevalley, T., Amman, P., & Rizzoli, R. (2015). *Protein intake and bone health*. Springer.
- Bonjour, J.-P., Theintz, G., Law, F., Slosman, D., & Rizzoli, R. (1994). Peak bone mass. *Osteoporosis international*, 4(1), S7-S13.
- Bonjour, J. P. (2011). Calcium and phosphate: a duet of ions playing for bone health. *J Am Coll Nutr*, 30(5 Suppl 1), 438S-448S.
- Boonen, S., Koutri, R., Dequeker, J., Aerssens, J., Lowet, G., Nijs, J., . . . Geusens, P. (1995). Measurement of femoral geometry in type I and type II osteoporosis: differences in hip axis length consistent with heterogeneity in the pathogenesis of osteoporotic fractures. *Journal of Bone and Mineral Research*, 10(12), 1908-1912.
- Boot, A. M., de Ridder, M. A., Pols, H. A., Krenning, E. P., & de Muinck Keizer-Schrama, S. M. (1997). Bone Mineral Density in Children and Adolescents: Relation to Puberty, Calcium Intake, and Physical Activity 1. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 82(1), 57-62.
- Borel, O., Gineyts, E., Bertholon, C., & Garnero, P. (2012). Cathepsin K preferentially solubilizes matured bone matrix. *Calcif Tissue Int*, 91(1), 32-39. doi: 10.1007/s00223-012-9604-7
- Boyle, W. J., Simonet, W. S., & Lacey, D. L. (2003). Osteoclast differentiation and activation. *Nature*, 423(6937), 337-342. doi: 10.1038/nature01658
- Brodsky, B., & Ramshaw, J. A. (1997). The collagen triple-helix structure. *Matrix Biol*, 15(8-9), 545-554.

- Bruyere, O., Zegels, B., Leonori, L., Rabenda, V., Janssen, A., Bourges, C., & Reginster, J. Y. (2012). Effect of collagen hydrolysate in articular pain: a 6-month randomized, double-blind, placebo controlled study. *Complement Ther Med*, 20(3), 124-130. doi: 10.1016/j.ctim.2011.12.007
- Bu, S. Y., Lerner, M., Stoecker, B. J., Boldrin, E., Brackett, D. J., Lucas, E. A., & Smith, B. J. (2008). Dried plum polyphenols inhibit osteoclastogenesis by downregulating NFATc1 and inflammatory mediators. *Calcified Tissue International*, 82(6), 475-488.
- Byrjalsen, I., Leeming, D. J., Qvist, P., Christiansen, C., & Karsdal, M. A. (2008). Bone turnover and bone collagen maturation in osteoporosis: effects of antiresorptive therapies. *Osteoporos Int*, 19(3), 339-348. doi: 10.1007/s00198-007-0462-5
- Carmeliet, G., Dermauw, V., & Bouillon, R. (2015). Vitamin D signalling in calcium and bone homeostasis: a delicate balance. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*(0). doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.beem.2015.06.001>
- Cashman, K. D. (2007). Diet, nutrition, and bone health. *The Journal of nutrition*, 137(11), 2507S-2512S.
- Castillo, A. B., Blundo, J. T., Chen, J. C., Lee, K. L., Yereddi, N. R., Jang, E., . . . Jacobs, C. R. (2012). Focal adhesion kinase plays a role in osteoblast mechanotransduction in vitro but does not affect load-induced bone formation in vivo. *PLoS One*, 7(9), e43291. doi: 10.1371/journal.pone.0043291
- Cesarec, G., Martinec, S., Basic, I., & Jakopic, D. (2014). Effect of exercises on quality of life in women with osteoporosis and osteopenia. *Coll Antropol*, 38(1), 247-254.
- Chen, G., Deng, C., & Li, Y. P. (2012). TGF-beta and BMP signaling in osteoblast differentiation and bone formation. *Int J Biol Sci*, 8(2), 272-288. doi: 10.7150/ijbs.2929
- Chiara, G., Letizia, F., Lorenzo, F., Edoardo, S., Diego, S., Stefano, S., . . . Barbara, Z. (2012). Nanostructured biomaterials for tissue engineered bone tissue reconstruction. *International journal of molecular sciences*, 13(1), 737-757.
- Christakos, S., Ajibade, D. V., Dhawan, P., Fechner, A. J., & Mady, L. J. (2010). Vitamin D: metabolism. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 39(2), 243-253, table of contents. doi: 10.1016/j.ecl.2010.02.002
- Christakos, S., Hewison, M., Gardner, D. G., Wagner, C. L., Sergeev, I. N., Rutten, E., . . . Bikle, D. D. (2013). Vitamin D: beyond bone. *Ann N Y Acad Sci*, 1287(1), 45-58.
- Clarke, B. (2008). Normal bone anatomy and physiology. *Clinical journal of the American Society of Nephrology*, 3(Supplement 3), S131-S139.
- Collette, J., Bruyère, O., Kaufman, J., Lorenc, R., Felsenberg, D., Spector, T., . . . Reginster, J.-Y. (2010). Vertebral anti-fracture efficacy of strontium ranelate according to pre-treatment bone turnover. *Osteoporosis international*, 21(2), 233-241.
- Comblain, F., Sanchez, C., Lespoune, I., Balligand, M., Serisier, S., & Henrotin, Y. (2015). Curcuminoids Extract, Hydrolyzed Collagen and Green Tea Extract Synergically Inhibit Inflammatory and Catabolic Mediator's Synthesis by Normal Bovine and Osteoarthritic Human Chondrocytes in Monolayer. *PLoS One*, 10(3).
- Conference, C. D. (1993). Diagnosis, prophylaxis, and treatment of osteoporosis. *Am J Med*, 94(6), 646-650.
- Conigrave, A., Brown, E., & Rizzoli, R. (2008). Dietary protein and bone health: roles of amino acid-sensing receptors in the control of calcium metabolism and bone homeostasis. *Annu. Rev. Nutr.*, 28, 131-155.
- Cooper, C., Campion, G., & Melton, L. J., 3rd. (1992). Hip fractures in the elderly: a world-wide projection. *Osteoporos Int*, 2(6), 285-289.
- Cosman, F., De Beur, S., LeBoff, M., Lewiecki, E., Tanner, B., Randall, S., & Lindsay, R. (2014). Clinician's guide to prevention and treatment of osteoporosis. *Osteoporosis international*, 25(10), 2359-2381.
- Coxon, F. P., & Taylor, A. (2008). *Vesicular trafficking in osteoclasts*. Paper presented at the Seminars in Cell & Developmental Biology.

- Crockett, J. C., Rogers, M. J., Coxon, F. P., Hocking, L. J., & Helfrich, M. H. (2011). Bone remodelling at a glance. *J Cell Sci*, 124(Pt 7), 991-998. doi: 10.1242/jcs.063032
- Cuneo, F., Costa-Paiva, L., Pinto-Neto, A. M., Morais, S. S., & Amaya-Farfan, J. (2010). Effect of dietary supplementation with collagen hydrolysates on bone metabolism of postmenopausal women with low mineral density. *Maturitas*, 65(3), 253-257. doi: 10.1016/j.maturitas.2009.10.002
- Curran, D., Maravic, M., Kiefer, P., Tochon, V., & Fardellone, P. (2010). Epidemiology of osteoporosis-related fractures in France: a literature review. *Joint Bone Spine*, 77(6), 546-551.
- Daneault, A., Coxam, V., Fabien Soulé, V., & Wittrant, Y. (2014). *Hydrolyzed collagen contributes to osteoblast differentiation in vitro and subsequent bone health in vivo*. Paper presented at the OARSI World Congress, Paris, France.
- Das, S., & Crockett, J. C. (2013). Osteoporosis - a current view of pharmacological prevention and treatment. *Drug Des Devel Ther*, 7, 435-448. doi: 10.2147/DDDT.S31504
- De Almeida Jackix, E., Cuneo, F., Amaya-Farfan, J., de Assuncao, J. V., & Quintaes, K. D. (2010). A food supplement of hydrolyzed collagen improves compositional and biodynamic characteristics of vertebrae in ovariectomized rats. *J Med Food*, 13(6), 1385-1390. doi: 10.1089/jmf.2009.0256
- Deal, C. L. (1997). Osteoporosis: prevention, diagnosis, and management. *The American journal of medicine*, 102(1), 35S-39S.
- Ding, J.-F., Li, Y.-Y., Xu, J.-J., Su, X.-R., Gao, X., & Yue, F.-P. (2011). Study on effect of jellyfish collagen hydrolysate on anti-fatigue and anti-oxidation. *Food Hydrocolloids*, 25(5), 1350-1353.
- Dominguez, L. J., Barbagallo, M., & Moro, L. (2005). Collagen overglycosylation: a biochemical feature that may contribute to bone quality. *Biochem Biophys Res Commun*, 330(1), 1-4.
- Du, J., Cullen, J. J., & Buettner, G. R. (2012). Ascorbic acid: chemistry, biology and the treatment of cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1820(2), 443-457.
- Duong, L. T., Lakkakorpi, P., Nakamura, I., & Rodan, G. A. (2000). Integrins and signaling in osteoclast function. *Matrix Biol*, 19(2), 97-105.
- Eriksen, E. F. (2012). Treatment of osteopenia. *Rev Endocr Metab Disord*, 13(3), 209-223. doi: 10.1007/s11154-011-9187-z
- Everts, V., & Saftig, P. (2011). Degradation of Bone and the Role of Osteoclasts, Bone Lining Cells and Osteocytes *Extracellular Matrix Degradation* (pp. 193-216): Springer.
- Exposito, J. Y., Valcourt, U., Cluzel, C., & Lethias, C. (2010). The fibrillar collagen family. *Int J Mol Sci*, 11(2), 407-426. doi: 10.3390/ijms11020407
- Eyre, D. (2002). Collagen of articular cartilage. *Arthritis research*, 4(1), 30-35.
- Fardellone, P., Cotte, F. E., Roux, C., Lespessailles, E., Mercier, F., & Gaudin, A. F. (2010). Calcium intake and the risk of osteoporosis and fractures in French women. *Joint Bone Spine*, 77(2), 154-158. doi: 10.1016/j.jbspin.2009.08.007
- Franceschi, R. T., Iyer, B. S., & Cui, Y. (1994). Effects of ascorbic acid on collagen matrix formation and osteoblast differentiation in murine MC3T3 - E1 cells. *Journal of Bone and Mineral Research*, 9(6), 843-854.
- Frassetto, L. A., Todd, K. M., Morris, R. C., & Sebastian, A. (2000). Worldwide Incidence of Hip Fracture in Elderly Women Relation to Consumption of Animal and Vegetable Foods. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, 55(10), M585-M592.
- Frei, B., Birlouez-Aragon, I., & Lykkesfeldt, J. (2012). Authors' perspective: What is the optimum intake of vitamin C in humans? *Crit Rev Food Sci Nutr*, 52(9), 815-829. doi: 10.1080/10408398.2011.649149
- Fu, Y., & Zhao, X.-H. (2013). In vitro responses of hFOB1.19 cells towards chum salmon (*Oncorhynchus keta*) skin gelatin hydrolysates in cell proliferation, cycle progression and apoptosis. *Journal of Functional Foods*, 5(1), 279-288. doi: 10.1016/j.jff.2012.10.017

- Fujita, T., Ohue, M., Fujii, Y., Miyauchi, A., & Takagi, Y. (2002). The effect of active absorbable algal calcium (AAA Ca) with collagen and other matrix components on back and joint pain and skin impedance. *J Bone Miner Metab*, 20(5), 298-302. doi: 10.1007/s007740200043
- Gallagher, J. C., & Sai, A. (2010). Molecular biology of bone remodeling: implications for new therapeutic targets for osteoporosis. *Maturitas*, 65(4), 301-307.
- Garnero, P., Borel, O., Byrjalsen, I., Ferreras, M., Drake, F. H., McQueney, M. S., . . . Delaisse, J. M. (1998). The collagenolytic activity of cathepsin K is unique among mammalian proteinases. *J Biol Chem*, 273(48), 32347-32352.
- Garnero, P., Ferreras, M., Karsdal, M. A., Nicamhlaoibh, R., Risteli, J., Borel, O., . . . Delaisse, J. M. (2003). The type I collagen fragments ICTP and CTX reveal distinct enzymatic pathways of bone collagen degradation. *J Bone Miner Res*, 18(5), 859-867. doi: 10.1359/jbmr.2003.18.5.859
- Gelse, K. (2003). Collagens—structure, function, and biosynthesis. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 55(12), 1531-1546. doi: 10.1016/j.addr.2003.08.002
- Glerup, H., Mikkelsen, K., Poulsen, L., Hass, E., Overbeck, S., Andersen, H., . . . Eriksen, E. (2000). Hypovitaminosis D myopathy without biochemical signs of osteomalacic bone involvement. *Calcified Tissue International*, 66(6), 419-424.
- Goldman, H. M., Thomas, C. D., Clement, J. G., & Bromage, T. G. (2005). Relationships among microstructural properties of bone at the human midshaft femur. *J Anat*, 206(2), 127-139. doi: 10.1111/j.1469-7580.2005.00385.x
- Golub, E. E. (2009). Role of matrix vesicles in biomineralization. *Biochim Biophys Acta*, 1790(12), 1592-1598. doi: 10.1016/j.bbagen.2009.09.006
- Golub, E. E., & Boesze-Battaglia, K. (2007). The role of alkaline phosphatase in mineralization. *Current Opinion in Orthopaedics*, 18(5), 444-448.
- Gómez-Guillén, M. C., Giménez, B., López-Caballero, M. E., & Montero, M. P. (2011). Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review. *Food Hydrocolloids*, 25(8), 1813-1827. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.02.007>
- Gonzalez, R., Ballester, I., Lopez-Posadas, R., Suárez, M., Zarzuelo, A., Martinez-Augustin, O., & Medina, F. S. D. (2011). Effects of flavonoids and other polyphenols on inflammation. *Critical reviews in food science and nutrition*, 51(4), 331-362.
- Gordon, M. K., & Hahn, R. A. (2010). Collagens. *Cell Tissue Res*, 339(1), 247-257. doi: 10.1007/s00441-009-0844-4
- Gougeon, R., Hoffer, L., Pencharz, P., & Marliss, E. (1992). Protein metabolism in obese subjects during a very-low-energy diet. *The American journal of clinical nutrition*, 56(1), 249S-254S.
- Grosso, G., Bei, R., Mistretta, A., Marventano, S., Calabrese, G., Masuelli, L., . . . Gazzolo, D. (2013). Effects of vitamin C on health: a review of evidence. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 18, 1017-1029.
- Guillermine, F., Beaupied, H., Fabien-Soule, V., Tome, D., Benhamou, C. L., Roux, C., & Blais, A. (2010). Hydrolyzed collagen improves bone metabolism and biomechanical parameters in ovariectomized mice: an in vitro and in vivo study. *Bone*, 46(3), 827-834. doi: 10.1016/j.bone.2009.10.035
- Guillermine, F., Fabien-Soule, V., Even, P. C., Tome, D., Benhamou, C. L., Roux, C., & Blais, A. (2012). Hydrolyzed collagen improves bone status and prevents bone loss in ovariectomized C3H/HeN mice. *Osteoporos Int*, 23(7), 1909-1919. doi: 10.1007/s00198-011-1788-6
- Habauzit, V., Nielsen, I.-L., Gil-Izquierdo, A., Trzeciakiewicz, A., Morand, C., Chee, W., . . . Williamson, G. (2009). Increased bioavailability of hesperetin-7-glucoside compared with hesperidin results in more efficient prevention of bone loss in adult ovariectomised rats. *British journal of nutrition*, 102(7), 976-984.

- Hagiwara, K., Goto, T., Araki, M., Miyazaki, H., & Hagiwara, H. (2011). Olive polyphenol hydroxytyrosol prevents bone loss. *European Journal of Pharmacology*, 662(1–3), 78-84. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2011.04.023>
- Han, X., Xu, Y., Wang, J., Pei, X., Yang, R., Li, N., & Li, Y. (2009). Effects of cod bone gelatin on bone metabolism and bone microarchitecture in ovariectomized rats. *Bone*, 44(5), 942-947. doi: 10.1016/j.bone.2008.12.005
- Hannan, M. T., Tucker, K. L., Dawson – Hughes, B., Cupples, L. A., Felson, D. T., & Kiel, D. P. (2000). Effect of dietary protein on bone loss in elderly men and women: the Framingham Osteoporosis Study. *Journal of Bone and Mineral Research*, 15(12), 2504-2512.
- Hays, N. P., Kim, H., Wells, A. M., Kajkenova, O., & Evans, W. J. (2009). Effects of whey and fortified collagen hydrolysate protein supplements on nitrogen balance and body composition in older women. *Journal of the American dietetic association*, 109(6), 1082-1087.
- Heaney, R. P., Abrams, S., Dawson-Hughes, B., Looker, A., Marcus, R., Matkovic, V., & Weaver, C. (2000). Peak bone mass. *Osteoporos Int*, 11(12), 985-1009. doi: 10.1007/s001980070020
- Heino, J. (2000). The collagen receptor integrins have distinct ligand recognition and signaling functions. *Matrix Biol*, 19(4), 319-323.
- Henriksen, K., Neutsky-Wulff, A. V., Bonewald, L. F., & Karsdal, M. A. (2009). Local communication on and within bone controls bone remodeling. *Bone*, 44(6), 1026-1033. doi: 10.1016/j.bone.2009.03.671
- Henrotin, Y., Lambert, C., Couchourel, D., Ripoll, C., & Chiotelli, E. (2011). Nutraceuticals: do they represent a new era in the management of osteoarthritis? - a narrative review from the lessons taken with five products. *Osteoarthritis Cartilage*, 19(1), 1-21. doi: 10.1016/j.joca.2010.10.017
- Hernlund, E., Svedbom, A., Ivergard, M., Compston, J., Cooper, C., Stenmark, J., . . . Kanis, J. A. (2013). Osteoporosis in the European Union: medical management, epidemiology and economic burden. A report prepared in collaboration with the International Osteoporosis Foundation (IOF) and the European Federation of Pharmaceutical Industry Associations (EFPIA). *Arch Osteoporos*, 8(1-2), 136. doi: 10.1007/s11657-013-0136-1
- Hillard, T. C., & Stevenson, J. C. (1991). Role of oestrogen in the development of osteoporosis. *Calcified Tissue International*, 49(1), S55-S59.
- Hjorten, R., Hansen, U., Underwood, R. A., Telfer, H. E., Fernandes, R. J., Krakow, D., . . . Pace, J. M. (2007). Type XXVII collagen at the transition of cartilage to bone during skeletogenesis. *Bone*, 41(4), 535-542. doi: 10.1016/j.bone.2007.06.024
- Hu, T., Rianon, N. J., Nettleton, J. A., Hyder, J. A., He, J., Steffen, L. M., . . . Bazzano, L. A. (2014). Protein intake and lumbar bone density: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *Br J Nutr*, 112(8), 1384-1392. doi: 10.1017/S0007114514002220
- Huang, J. C., Sakata, T., Pfleger, L. L., Bencsik, M., Halloran, B. P., Bikle, D. D., & Nissenson, R. A. (2004). PTH differentially regulates expression of RANKL and OPG. *J Bone Miner Res*, 19(2), 235-244. doi: 10.1359/JBMR.0301226
- Ichikawa, S., Morifuji, M., Ohara, H., Matsumoto, H., Takeuchi, Y., & Sato, K. (2010). Hydroxyproline-containing dipeptides and tripeptides quantified at high concentration in human blood after oral administration of gelatin hydrolysate. *Int J Food Sci Nutr*, 61(1), 52-60. doi: 10.3109/09637480903257711
- Imai, Y., Youn, M.-Y., Kondoh, S., Nakamura, T., Kouzmenko, A., Matsumoto, T., . . . Kato, S. (2009). Estrogens Maintain Bone Mass by Regulating Expression of Genes Controlling Function and Life Span in Mature Osteoclasts. *Ann N Y Acad Sci*, 1173, E31-E39. doi: 10.1111/j.1749-6632.2009.04954.x
- INSEE. (2014). Évolution de l'espérance de vie à divers âges. 2015, from http://www.insee.fr/fr/themes/tableau.asp?reg_id=0&ref_id=NATnon02229

- Iwai, K., Hasegawa, T., Taguchi, Y., Morimatsu, F., Sato, K., Nakamura, Y., . . . Ohtsuki, K. (2005). Identification of food-derived collagen peptides in human blood after oral ingestion of gelatin hydrolysates. *J Agric Food Chem*, 53(16), 6531-6536. doi: 10.1021/jf050206p
- Jackson, R. D., LaCroix, A. Z., Gass, M., Wallace, R. B., Robbins, J., Lewis, C. E., . . . Barad, D. (2006). Calcium plus vitamin D supplementation and the risk of fractures. *N Engl J Med*, 354(7), 669-683. doi: 10.1056/NEJMoa055218
- James, A. W. (2013). Review of signaling pathways governing MSC osteogenic and adipogenic differentiation. *Scientifica*, 2013.
- Jesudason, D., & Clifton, P. (2011). The interaction between dietary protein and bone health. *J Bone Miner Metab*, 29(1), 1-14. doi: 10.1007/s00774-010-0225-9
- Kadler, K. E., Holmes, D. F., Trotter, J. A., & Chapman, J. A. (1996). Collagen fibril formation. *Biochem J*, 316 (Pt 1), 1-11.
- Kafantari, H., Kounadi, E., Fatouros, M., Milonakis, M., & Tzaphlidou, M. (2000). Structural alterations in rat skin and bone collagen fibrils induced by ovariectomy. *Bone*, 28(4), 349-353. doi: 10.1016/s8756-3282(99)00279-3
- Kahai, S., Vary, C. P., Gao, Y., & Seth, A. (2004). Collagen, type V, alpha1 (COL5A1) is regulated by TGF-beta in osteoblasts. *Matrix Biol*, 23(7), 445-455. doi: 10.1016/j.matbio.2004.09.004
- Kalu, D. N. (1991). The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. *Bone and Mineral*, 13(3), 175-191. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/0169-6009\(91\)90124-I](http://dx.doi.org/10.1016/0169-6009(91)90124-I)
- Kamel, H. K. (2006). Postmenopausal osteoporosis: etiology, current diagnostic strategies, and nonprescription interventions. *JOURNAL OF MANAGED CARE PHARMACY*, 12(6), S4.
- Kamel, H. K., & O Connell, M. B. (2006). Introduction: postmenopausal osteoporosis as a major public health issue. *JOURNAL OF MANAGED CARE PHARMACY*, 12(6), S2.
- Kanakamani, J., & Tandon, N. (2008). Newer therapies in osteoporosis. *Indian Journal of Rheumatology*, 3(4), 148-157.
- Kanis, J. A. (1994). Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis: synopsis of a WHO report. WHO Study Group. *Osteoporos Int*, 4(6), 368-381.
- Kanis, J. A., Burlet, N., Cooper, C., Delmas, P. D., Reginster, J. Y., Borgstrom, F., & Rizzoli, R. (2008). European guidance for the diagnosis and management of osteoporosis in postmenopausal women. *Osteoporos Int*, 19(4), 399-428. doi: 10.1007/s00198-008-0560-z
- Kanis, J. A., & McCloskey, E. V. (1998). Risk factors in osteoporosis. *Maturitas*, 30(3), 229-233. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0378-5122\(98\)00090-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-5122(98)00090-5)
- Karaguzel, G., & Holick, M. F. (2010). Diagnosis and treatment of osteopenia. *Rev Endocr Metab Disord*, 11(4), 237-251. doi: 10.1007/s11154-010-9154-0
- Kawaguchi, T., Nanbu, P. N., & Kurokawa, M. (2012). Distribution of prolylhydroxyproline and its metabolites after oral administration in rats. *Biol Pharm Bull*, 35(3), 422-427.
- Kawai, T., Matsuyama, T., Hosokawa, Y., Makihiro, S., Seki, M., Karimbux, N. Y., . . . Taubman, M. A. (2006). B and T lymphocytes are the primary sources of RANKL in the bone resorptive lesion of periodontal disease. *Am J Pathol*, 169(3), 987-998. doi: 10.2353/ajpath.2006.060180
- Keene, D. R., Sakai, L. Y., & Burgeson, R. E. (1991). Human bone contains type III collagen, type VI collagen, and fibrillin: type III collagen is present on specific fibers that may mediate attachment of tendons, ligaments, and periosteum to calcified bone cortex. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 39(1), 59-69. doi: 10.1177/39.1.1983874
- Kim, H. K., Kim, M. G., & Leem, K. H. (2013). Osteogenic activity of collagen peptide via ERK/MAPK pathway mediated boosting of collagen synthesis and its therapeutic efficacy in osteoporotic bone by back-

- scattered electron imaging and microarchitecture analysis. *Molecules*, 18(12), 15474-15489. doi: 10.3390/molecules181215474
- Kim, H. K., Kim, M. G., & Leem, K. H. (2014). Collagen hydrolysates increased osteogenic gene expressions via a MAPK signaling pathway in MG-63 human osteoblasts. *Food Funct*, 5(3), 573-578. doi: 10.1039/c3fo60509d
- Kim, J.-B., Leucht, P., Luppen, C. A., Park, Y. J., Beggs, H. E., Damsky, C. H., & Helms, J. A. (2007). Reconciling the roles of FAK in osteoblast differentiation, osteoclast remodeling, and bone regeneration. *Bone*, 41(1), 39-51. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bone.2007.01.024>
- Kim, T.-H., Jung, J. W., Ha, B. G., Hong, J. M., Park, E. K., Kim, H.-J., & Kim, S.-Y. (2011). The effects of luteolin on osteoclast differentiation, function in vitro and ovariectomy-induced bone loss. *The Journal of nutritional biochemistry*, 22(1), 8-15.
- Kivirikko, K. I., & Myllyla, R. (1985). Post-translational processing of procollagens. *Ann N Y Acad Sci*, 460, 187-201.
- Klein, T., & Bischoff, R. (2011). Physiology and pathophysiology of matrix metalloproteases. *Amino Acids*, 41(2), 271-290. doi: 10.1007/s00726-010-0689-x
- Komori, T. (2006). Regulation of osteoblast differentiation by transcription factors. *J Cell Biochem*, 99(5), 1233-1239.
- Krum, S. A., Miranda-Carboni, G. A., Hauschka, P. V., Carroll, J. S., Lane, T. F., Freedman, L. P., & Brown, M. (2008). Estrogen protects bone by inducing Fas ligand in osteoblasts to regulate osteoclast survival. *EMBO J*, 27(3), 535-545. doi: 10.1038/sj.emboj.7601984
- Kuroki, Y., Shiozawa, S., Kano, J., & Chihara, K. (1995). Competition between c-fos and 1,25(OH)₂ vitamin D₃ in the transcriptional control of type I collagen synthesis in MC3T3-E1 osteoblastic cells. *J Cell Physiol*, 164(3), 459-464. doi: 10.1002/jcp.1041640303
- Labronici, P. J., Blunck, S. S., Lana, F. R., Esteves, B. B., Franco, J. S., Fukuyama, J. M., & Pires, R. E. S. (2013). Vitamin D and its relation to bone mineral density in postmenopause women. *Revista Brasileira de Ortopedia*, 48(3), 228-235.
- Lane, N. E. (2006). Epidemiology, etiology, and diagnosis of osteoporosis. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 194(2, Supplement), S3-S11. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajog.2005.08.047>
- Langdahl, B. L., Mortensen, L., Vesterby, A., Eriksen, E. F., & Charles, P. (1996). Bone histomorphometry in hypoparathyroid patients treated with vitamin D. *Bone*, 18(2), 103-108. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/8756-3282\(95\)00443-2](http://dx.doi.org/10.1016/8756-3282(95)00443-2)
- Laskey, M. A. (1996). Dual-energy X-ray absorptiometry and body composition. *Nutrition*, 12(1), 45-51. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/0899-9007\(95\)00017-8](http://dx.doi.org/10.1016/0899-9007(95)00017-8)
- Le Nihouannen, D., Barralet, J. E., Fong, J. E., & Komarova, S. V. (2010). Ascorbic acid accelerates osteoclast formation and death. *Bone*, 46(5), 1336-1343.
- Leem, K. H., Lee, S., Jang, A., & Kim, H. K. (2013). Porcine skin gelatin hydrolysate promotes longitudinal bone growth in adolescent rats. *J Med Food*, 16(5), 447-453. doi: 10.1089/jmf.2012.2461
- Léotoing, L., Wauquier, F., Guicheux, J., Miot-Noirault, E., Wittrant, Y., & Coxam, V. (2013). The polyphenol fisetin protects bone by repressing NF- κ B and MKP-1-dependent signaling pathways in osteoclasts. *PLoS One*, 8(7), e68388.
- Lespessailles, É., Cotté, F.-E., Roux, C., Fardellone, P., Mercier, F., & Gaudin, A.-F. (2009). Prevalence and features of osteoporosis in the French general population: the Instant study. *Joint Bone Spine*, 76(4), 394-400.
- Leveille, S. G., LaCroix, A. Z., Koepsell, T. D., Beresford, S. A., Van Belle, G., & Buchner, D. M. (1997). Dietary vitamin C and bone mineral density in postmenopausal women in Washington State, USA. *J Epidemiol Community Health*, 51(5), 479-485.

- Lieben, L., & Carmeliet, G. (2013). Vitamin D signaling in osteocytes: effects on bone and mineral homeostasis. *Bone*, 54(2), 237-243. doi: 10.1016/j.bone.2012.10.007
- Lim, V., & Clarke, B. L. (2012). New therapeutic targets for osteoporosis: beyond denosumab. *Maturitas*, 73(3), 269-272. doi: 10.1016/j.maturitas.2012.08.002
- Lips, P. (2006). Vitamin D physiology. *Progress in biophysics and molecular biology*, 92(1), 4-8.
- Liu, C., & Sun, J. (2014). Potential application of hydrolyzed fish collagen for inducing the multidirectional differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells. *Biomacromolecules*, 15(1), 436-443. doi: 10.1021/bm401780v
- Liu, J., Zhang, B., Song, S., Ma, M., Si, S., Wang, Y., . . . Guo, Y. (2014). Bovine collagen peptides compounds promote the proliferation and differentiation of MC3T3-E1 pre-osteoblasts. *PLoS One*, 9(6), e99920. doi: doi:10.1371/journal.pone.0099920
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S. L., Matsudaira, P., Baltimore, D., & Darnell, J. (2000). Collagen: the fibrous proteins of the matrix.
- Maggio, D., Barabani, M., Pierandrei, M., Polidori, M. C., Catani, M., Mecocci, P., . . . Cherubini, A. (2003). Marked decrease in plasma antioxidants in aged osteoporotic women: results of a cross-sectional study. *J Clin Endocrinol Metab*, 88(4), 1523-1527. doi: 10.1210/jc.2002-021496
- Mangano, K. M., Sahni, S., & Kerstetter, J. E. (2014). Dietary protein is beneficial to bone health under conditions of adequate calcium intake: an update on clinical research. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 17(1), 69-74. doi: 10.1097/MCO.000000000000013
- Manka, S. W., Carafoli, F., Visse, R., Bihan, D., Raynal, N., Farndale, R. W., . . . Nagase, H. (2012). Structural insights into triple-helical collagen cleavage by matrix metalloproteinase 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(31), 12461-12466. doi: 10.1073/pnas.1204991109
- Mansell, J. P., & Bailey, A. J. (2003). Increased metabolism of bone collagen in post-menopausal female osteoporotic femoral heads. *Int J Biochem Cell Biol*, 35(4), 522-529.
- Marie, P. J. (2008). Transcription factors controlling osteoblastogenesis. *Archives of biochemistry and biophysics*, 473(2), 98-105.
- Martin-Bautista, E., Martin-Matillas, M., Martin-Lagos, J. A., Miranda-Leon, M. T., Munoz-Torres, M., Ruiz-Requena, E., . . . Campoy, C. (2011). A nutritional intervention study with hydrolyzed collagen in pre-pubertal spanish children: influence on bone modeling biomarkers. *J Pediatr Endocrinol Metab*, 24(3-4), 147-153.
- Martin, C. A. (2001). *Apports Nutritionnels Conseillés pour la Population Française* (TEC&DOC Ed. 3e édition ed.).
- Matsuo, K., & Irie, N. (2008). Osteoclast—osteoblast communication. *Archives of biochemistry and biophysics*, 473(2), 201-209.
- Mizuno, M., Fujisawa, R., & Kuboki, Y. (2000). Type I collagen - induced osteoblastic differentiation of bone - marrow cells mediated by collagen - $\alpha 2 \beta 1$ integrin interaction. *Journal of cellular physiology*, 184(2), 207-213.
- Mizuno, M., & Kuboki, Y. (2001). Osteoblast-related gene expression of bone marrow cells during the osteoblastic differentiation induced by type I collagen. *J Biochem*, 129(1), 133-138.
- Monroe, D., Secreto, F., & Spelsberg, T. (2003). Overview of estrogen action in osteoblasts: Role of the ligand, the receptor, and the co-regulators. *Journal of Musculoskeletal and Neuronal Interactions*, 3(4), 357-362.
- Morgan, S., Poundarik, A. A., & Vashishth, D. (2015). Do Non-collagenous Proteins Affect Skeletal Mechanical Properties? *Calcified Tissue International*, 1-11.
- Morin, S., Lix, L., Azimae, M., Metge, C., Caetano, P., & Leslie, W. (2011). Mortality rates after incident non-traumatic fractures in older men and women. *Osteoporosis international*, 22(9), 2439-2448.

- Morton, D. J., Barrett - Connor, E. L., & Schneider, D. L. (2001). Vitamin C supplement use and bone mineral density in postmenopausal women. *Journal of Bone and Mineral Research*, 16(1), 135-140.
- Moskowitz, R. W. (2000). Role of collagen hydrolysate in bone and joint disease. *Semin Arthritis Rheum*, 30(2), 87-99. doi: 10.1053/sarh.2000.9622
- Mundy, G. R., & Guise, T. A. (1999). Hormonal control of calcium homeostasis. *Clinical chemistry*, 45(8), 1347-1352.
- Murad, S., Grove, D., Lindberg, K. A., Reynolds, G., Sivarajah, A., & Pinnell, S. R. (1981). Regulation of collagen synthesis by ascorbic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 78(5), 2879-2882.
- Nakamura, T., Imai, Y., Matsumoto, T., Sato, S., Takeuchi, K., Igarashi, K., . . . Yamamoto, Y. (2007). Estrogen prevents bone loss via estrogen receptor α and induction of Fas ligand in osteoclasts. *Cell*, 130(5), 811-823.
- Naylor, K., & Eastell, R. (2012). Bone turnover markers: use in osteoporosis. *Nature Reviews Rheumatology*, 8(7), 379-389.
- Nelson, E. R., Wardell, S. E., & McDonnell, D. P. (2013). The molecular mechanisms underlying the pharmacological actions of estrogens, SERMs and oxysterols: implications for the treatment and prevention of osteoporosis. *Bone*, 53(1), 42-50. doi: 10.1016/j.bone.2012.11.011
- Nerenberg, P. S., & Stultz, C. M. (2008). Differential unfolding of $\alpha 1$ and $\alpha 2$ chains in type I collagen and collagenolysis. *J Mol Biol*, 382(1), 246-256. doi: 10.1016/j.jmb.2008.07.009
- Nesbitt, S., Nesbit, A., Helfrich, M., & Horton, M. (1993). Biochemical characterization of human osteoclast integrins. Osteoclasts express $\alpha v \beta 3$, $\alpha 2 \beta 1$, and $\alpha v \beta 1$ integrins. *J Biol Chem*, 268(22), 16737-16745.
- Nikel, O., Laurencin, D., McCallum, S. A., Gundberg, C. M., & Vashishth, D. (2013). NMR investigation of the role of osteocalcin and osteopontin at the organic-inorganic interface in bone. *Langmuir*, 29(45), 13873-13882. doi: 10.1021/la403203w
- Noble, B. S. (2008). The osteocyte lineage. *Arch Biochem Biophys*, 473(2), 106-111. doi: 10.1016/j.abb.2008.04.009
- Nomura, Y., Ohashi, K., Watanabe, M., & Kasugai, S. (2005). Increase in bone mineral density through oral administration of shark gelatin to ovariectomized rats. *Nutrition*, 21(11-12), 1120-1126. doi: 10.1016/j.nut.2005.03.007
- Novack, D. V. (2007). Estrogen and bone: osteoclasts take center stage. *Cell Metab*, 4(4), 254-256. doi: 10.1016/j.cmet.2007.09.007
- Nyman, J. S., Lynch, C. C., Perrien, D. S., Thiolloy, S., O'Quinn, E. C., Patil, C. A., . . . Mundy, G. R. (2011). Differential effects between the loss of MMP-2 and MMP-9 on structural and tissue-level properties of bone. *J Bone Miner Res*, 26(6), 1252-1260. doi: 10.1002/jbmr.326
- Oesser, S., Adam, M., Babel, W., & Seifert, J. (1999). Oral administration of (14)C labeled gelatin hydrolysate leads to an accumulation of radioactivity in cartilage of mice (C57/BL). *J Nutr*, 129(10), 1891-1895.
- Ohara, H., Matsumoto, H., Ito, K., Iwai, K., & Sato, K. (2007). Comparison of quantity and structures of hydroxyproline-containing peptides in human blood after oral ingestion of gelatin hydrolysates from different sources. *J Agric Food Chem*, 55(4), 1532-1535. doi: 10.1021/jf062834s
- Orgel, J. P., Miller, A., Irving, T. C., Fischetti, R. F., Hammersley, A. P., & Wess, T. J. (2001). The in situ supermolecular structure of type I collagen. *Structure*, 9(11), 1061-1069.
- Orimo, H. (2010). The mechanism of mineralization and the role of alkaline phosphatase in health and disease. *Journal of Nippon Medical School*, 75(1), 4-12.
- Otsuka, E., Kato, Y., Hirose, S., & Hagiwara, H. (2000). Role of Ascorbic Acid in the Osteoclast Formation: Induction of Osteoclast Differentiation Factor with Formation of the Extracellular Collagen Matrix 1. *Endocrinology*, 141(8), 3006-3011.

- Ottani, V., Martini, D., Franchi, M., Ruggeri, A., & Raspanti, M. (2002). Hierarchical structures in fibrillar collagens. *Micron*, 33(7-8), 587-596.
- Persikov, A. V., Ramshaw, J. A., Kirkpatrick, A., & Brodsky, B. (2002). Peptide investigations of pairwise interactions in the collagen triple-helix. *J Mol Biol*, 316(2), 385-394.
- Pfeifer, M., Begerow, B., & Minne, H. (2002). Vitamin D and muscle function. *Osteoporosis international*, 13(3), 187-194.
- Puel, C., Mardon, J., Agalias, A., Davicco, M. J., Lebecque, P., Mazur, A., . . . Coxam, V. (2008). Major phenolic compounds in olive oil modulate bone loss in an ovariectomy/inflammation experimental model. *J Agric Food Chem*, 56(20), 9417-9422. doi: 10.1021/jf801794q
- Puel, C., Quintin, A., Agalias, A., Mathey, J., Obled, C., Mazur, A., . . . Coxam, V. (2004). Olive oil and its main phenolic micronutrient (oleuropein) prevent inflammation-induced bone loss in the ovariectomised rat. *British journal of nutrition*, 92(01), 119-127.
- Ragab, A. A., Lavish, S. A., Banks, M. A., Goldberg, V. M., & Greenfield, E. M. (1998). Osteoclast differentiation requires ascorbic acid. *Journal of Bone and Mineral Research*, 13(6), 970-977.
- Raggatt, L. J., & Partridge, N. C. (2010). Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling. *Journal of Biological Chemistry*, 285(33), 25103-25108.
- Ramachandran, G. N., & Kartha, G. (1954). Structure of collagen. *Nature*, 174(4423), 269-270.
- Ramshaw, J. A., Shah, N. K., & Brodsky, B. (1998). Gly-X-Y tripeptide frequencies in collagen: a context for host-guest triple-helical peptides. *J Struct Biol*, 122(1-2), 86-91. doi: 10.1006/jsbi.1998.3977
- Rao, L., Rao, A., & Kang, N. (2012). *Polyphenol Antioxidants and Bone Health: A Review*. INTECH Open Access Publisher.
- Ray, B. J., Thomas, K., Huang, C. S., Gutknecht, M. F., Botchwey, E. A., & Bouton, A. H. (2012). Regulation of osteoclast structure and function by FAK family kinases. *J Leukoc Biol*, 92(5), 1021-1028. doi: 10.1189/jlb.0512259
- Recker, R., Lappe, J., Davies, K. M., & Heaney, R. (2004). Bone remodeling increases substantially in the years after menopause and remains increased in older osteoporosis patients. *Journal of Bone and Mineral Research*, 19(10), 1628-1633.
- Reid, I. R. (2002). Pharmacotherapy of osteoporosis in postmenopausal women: focus on safety. *Expert opinion on drug safety*, 1(1), 93-107.
- Reid, I. R. (2008). Anti-resorptive therapies for osteoporosis. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 19(5), 473-478. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.semcdb.2008.08.002>
- Ricard-Blum, S. (2011). The collagen family. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 3(1), a004978. doi: 10.1101/cshperspect.a004978
- Ricard-Blum, S., & Ville, G. (1989). Collagen cross-linking. *International Journal of Biochemistry*, 21(11), 1185-1189.
- Rizzoli, R., Ammann, P., Chevalley, T., & Bonjour, J.-P. (2001). Protein intake and bone disorders in the elderly. *Joint Bone Spine*, 68(5), 383-392.
- Rizzoli, R., Stevenson, J. C., Bauer, J. M., van Loon, L. J., Walrand, S., Kanis, J. A., . . . Force, E. T. (2014). The role of dietary protein and vitamin D in maintaining musculoskeletal health in postmenopausal women: a consensus statement from the European Society for Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis and Osteoarthritis (ESCEO). *Maturitas*, 79(1), 122-132. doi: 10.1016/j.maturitas.2014.07.005
- Robert-Bobée, I. (2007). Projections de population 2005-2050: vieillissement de la population en France métropolitaine. *Economie et statistique*, 408(1), 95-112.

- Robins, S. P., Duncan, A., Wilson, N., & Evans, B. J. (1996). Standardization of pyridinium crosslinks, pyridinoline and deoxypyridinoline, for use as biochemical markers of collagen degradation. *Clin Chem*, 42(10), 1621-1626.
- Romagnoli, E., Del Fiacco, R., Russo, S., Piemonte, S., Fidanza, F., Colapietro, F., . . . Minisola, S. (2011). Secondary osteoporosis in men and women: clinical challenge of an unresolved issue. *J Rheumatol*, 38(8), 1671-1679. doi: 10.3899/jrheum.110030
- Rosati, R., Horan, G. S., Pinero, G. J., Garofalo, S., Keene, D. R., Horton, W. A., . . . Behringer, R. R. (1994). Normal long bone growth and development in type X collagen-null mice. *Nat Genet*, 8(2), 129-135.
- Sahni, S., Hannan, M. T., Gagnon, D., Blumberg, J., Cupples, L. A., Kiel, D. P., & Tucker, K. L. (2009). Protective effect of total and supplemental vitamin C intake on the risk of hip fracture--a 17-year follow-up from the Framingham Osteoporosis Study. *Osteoporos Int*, 20(11), 1853-1861. doi: 10.1007/s00198-009-0897-y
- Salaszyk, R. M., Klees, R. F., Williams, W. A., Boskey, A., & Plopper, G. E. (2007). Focal adhesion kinase signaling pathways regulate the osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Experimental Cell Research*, 313(1), 22-37. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.yexcr.2006.09.013>
- Salaszyk, R. M., Williams, W. A., Boskey, A., Batorsky, A., & Plopper, G. E. (2004). Adhesion to vitronectin and collagen I promotes osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *BioMed Research International*, 2004(1), 24-34.
- Sambrook, P., & Cooper, C. (2006). Osteoporosis. *Lancet*, 367(9527), 2010-2018. doi: 10.1016/S0140-6736(06)68891-0
- Sambrook, P. N., Seeman, E., Phillips, S. R., & Ebeling, P. R. (2002). Preventing osteoporosis: outcomes of the Australian fracture prevention summit. *Med J Aust*, 178(8 Suppl), 1-16.
- Sanguineti, R., Puddu, A., Mach, F., Montecucco, F., & Viviani, G. L. (2014). Advanced Glycation End Products Play Adverse Proinflammatory Activities in Osteoporosis. *Mediators of inflammation*, 2014.
- Sapir-Koren, R., & Livshits, G. (2011). Bone mineralization and regulation of phosphate homeostasis. *IBMS BoneKEy*, 8(6), 286-300.
- Schauss, A., Merkel, D., Glaza, S., & Sorenson, S. (2007). Acute and subchronic oral toxicity studies in rats of a hydrolyzed chicken sternal cartilage preparation. *Food and chemical toxicology*, 45(2), 315-321.
- Scheiber, L. B., 2nd, & Torregrosa, L. (1998). Evaluation and treatment of postmenopausal osteoporosis. *Semin Arthritis Rheum*, 27(4), 245-261.
- Schulze, C., & Oesser, S. (2007). Collagen hydrolysate supplementation stimulates proteoglycan metabolism and gene expression of articular chondrocytes.
- Shen, C.-L., Yeh, J. K., Cao, J. J., & Wang, J.-S. (2009). Green tea and bone metabolism. *Nutrition Research*, 29(7), 437-456. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nutres.2009.06.008>
- Shen, H., Recker, R., & Deng, H.-W. (2003). Molecular and genetic mechanisms of osteoporosis: implication for treatment. *Current molecular medicine*, 3(8), 737-757.
- Shigemura, Y., Akaba, S., Kawashima, E., Park, E. Y., Nakamura, Y., & Sato, K. (2011). Identification of a novel food-derived collagen peptide, hydroxyprolyl-glycine, in human peripheral blood by pre-column derivatisation with phenyl isothiocyanate. *Food Chemistry*, 129(3), 1019-1024. doi: 10.1016/j.foodchem.2011.05.066
- Shoulders, M. D., & Raines, R. T. (2009). Collagen structure and stability. *Annu Rev Biochem*, 78, 929-958. doi: 10.1146/annurev.biochem.77.032207.120833
- Siebers, M. C., ter Brugge, P. J., Walboomers, X. F., & Jansen, J. A. (2005). Integrins as linker proteins between osteoblasts and bone replacing materials. A critical review. *Biomaterials*, 26(2), 137-146. doi: 10.1016/j.biomaterials.2004.02.021

- Simon, J. A., & Hudes, E. S. (2001). Relation of ascorbic acid to bone mineral density and self-reported fractures among US adults. *Am J Epidemiol*, 154(5), 427-433.
- Sims, N. A., & Martin, T. J. (2014). Coupling the activities of bone formation and resorption: a multitude of signals within the basic multicellular unit. *Bonekey Rep*, 3, 481. doi: 10.1038/bonekey.2013.215
- Soderhall, C., Marenholz, I., Kerscher, T., Ruschendorf, F., Esparza-Gordillo, J., Worm, M., . . . Lee, Y. A. (2007). Variants in a novel epidermal collagen gene (COL29A1) are associated with atopic dermatitis. *PLoS Biol*, 5(9), e242. doi: 10.1371/journal.pbio.0050242
- Spilmont, M., Leotoing, L., Davicco, M. J., Lebecque, P., Mercier, S., Miot-Noirault, E., . . . Coxam, V. (2014). Pomegranate and its derivatives can improve bone health through decreased inflammation and oxidative stress in an animal model of postmenopausal osteoporosis. *Eur J Nutr*, 53(5), 1155-1164. doi: 10.1007/s00394-013-0615-6
- St-Arnaud, R. (2008). The direct role of vitamin D on bone homeostasis. *Archives of biochemistry and biophysics*, 473(2), 225-230. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.abb.2008.03.038>
- Sugihara, F., Inoue, N., Kuwamori, M., & Taniguchi, M. (2012). Quantification of hydroxyprolyl-glycine (Hyp-Gly) in human blood after ingestion of collagen hydrolysate. *J Biosci Bioeng*, 113(2), 202-203. doi: 10.1016/j.jbiosc.2011.09.024
- Svedbom, A., Hernlund, E., Ivergård, M., Compston, J., Cooper, C., Stenmark, J., . . . Kanis, J. (2013). Osteoporosis in the European Union: a compendium of country-specific reports. *Archives of osteoporosis*, 8(1-2), 1-218.
- Symons, T. B., Sheffield-Moore, M., Wolfe, R. R., & Paddon-Jones, D. (2009). A moderate serving of high-quality protein maximally stimulates skeletal muscle protein synthesis in young and elderly subjects. *Journal of the American dietetic association*, 109(9), 1582-1586.
- Takahashi, N., Udagawa, N., & Suda, T. (2014). Vitamin D endocrine system and osteoclasts. *Bonekey Rep*, 3. doi: 10.1038/bonekey.2013.229
- Takeda, S., Park, J. H., Kawashima, E., Ezawa, I., & Omi, N. (2013). Hydrolyzed collagen intake increases bone mass of growing rats trained with running exercise. *J Int Soc Sports Nutr*, 10(1), 35. doi: 10.1186/1550-2783-10-35
- Tamura, Y., Takeuchi, Y., Suzawa, M., Fukumoto, S., Kato, M., Miyazono, K., & Fujita, T. (2001). Focal Adhesion Kinase Activity Is Required for Bone Morphogenetic Protein—Smad1 Signaling and Osteoblastic Differentiation in Murine MC3T3-E1 Cells. *Journal of Bone and Mineral Research*, 16(10), 1772-1779. doi: 10.1359/jbmr.2001.16.10.1772
- Tanriover, M. D., Oz, S. G., Tanriover, A., Kilcarslan, A., Turkmen, E., Guven, G. S., . . . Sozen, T. (2010). Hip fractures in a developing country: osteoporosis frequency, predisposing factors and treatment costs. *Arch Gerontol Geriatr*, 50(3), e13-18. doi: 10.1016/j.archger.2009.04.010
- Theoleyre, S., Wittrant, Y., Tat, S. K., Fortun, Y., Redini, F., & Heymann, D. (2004). The molecular triad OPG/RANK/RANKL: involvement in the orchestration of pathophysiological bone remodeling. *Cytokine Growth Factor Rev*, 15(6), 457-475. doi: 10.1016/j.cytogfr.2004.06.004
- Thorpe, M. P., & Evans, E. M. (2011). Dietary protein and bone health: harmonizing conflicting theories. *Nutrition reviews*, 69(4), 215-230.
- Trc, T., & Bohmova, J. (2011). Efficacy and tolerance of enzymatic hydrolysed collagen (EHC) vs. glucosamine sulphate (GS) in the treatment of knee osteoarthritis (KOA). *Int Orthop*, 35(3), 341-348. doi: 10.1007/s00264-010-1010-z
- Trzeciakiewicz, A., Habauzit, V., & Horcajada, M. N. (2009). When nutrition interacts with osteoblast function: molecular mechanisms of polyphenols. *Nutr Res Rev*, 22(1), 68-81. doi: 10.1017/S095442240926402X

- Tsuneto, M., Yamazaki, H., Yoshino, M., Yamada, T., & Hayashi, S.-I. (2005). Ascorbic acid promotes osteoclastogenesis from embryonic stem cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 334(4), 1239-1246.
- Tsuruoka, N., Yamato, R., Sakai, Y., Yoshitake, Y., & Yonekura, H. (2007). Promotion by Collagen Tripeptide of Type I Collagen Gene Expression in Human Osteoblastic Cells and Fracture Healing of Rat Femur. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 71(11), 2680-2687. doi: 10.1271/bbb.70287
- Tucker, K. L., Hannan, M. T., & Kiel, D. P. (2001). The acid-base hypothesis: diet and bone in the Framingham Osteoporosis Study. *European journal of nutrition*, 40(5), 231-237.
- Tzaphlidou, M. (2005). The role of collagen in bone structure: an image processing approach. *Micron*, 36(7), 593-601.
- Uehara, K., Takahashi, A., Watanabe, M., & Nomura, Y. (2014). Shark protein improves bone mineral density in ovariectomized rats and inhibits osteoclast differentiation. *Nutrition*, 30(6), 719-725. doi: 10.1016/j.nut.2013.11.005
- Unnanuntana, A., Gladnick, B. P., Donnelly, E., & Lane, J. M. (2010). The assessment of fracture risk. *J Bone Joint Surg Am*, 92(3), 743-753. doi: 10.2106/JBJS.I.00919
- Vaananen, H. K., Zhao, H., Mulari, M., & Halleen, J. M. (2000). The cell biology of osteoclast function. *J Cell Sci*, 113 (Pt 3), 377-381.
- van Driel, M., & van Leeuwen, J. P. (2014). Vitamin D endocrine system and osteoblasts. *Bonekey Rep*, 3, 493. doi: 10.1038/bonekey.2013.227
- Van Vlijven, J., Luijsterburg, P., Verhagen, A., Van Osch, G., Kloppenburg, M., & Bierma-Zeinstra, S. (2012). Symptomatic and chondroprotective treatment with collagen derivatives in osteoarthritis: a systematic review. *Osteoarthritis and Cartilage*, 20(8), 809-821.
- Vasikaran, S., Eastell, R., Bruyère, O., Foldes, A., Garnero, P., Griesmacher, A., . . . Trenti, T. (2011). Markers of bone turnover for the prediction of fracture risk and monitoring of osteoporosis treatment: a need for international reference standards. *Osteoporosis international*, 22(2), 391-420.
- Vignon, É. (2000). Structure et métabolisme du cartilage articulaire. *Revue du Rhumatisme*, 67, Supplement 30, 112-118. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S1169-8330\(00\)80088-5](http://dx.doi.org/10.1016/S1169-8330(00)80088-5)
- Viguet-Carrin, S., Garnero, P., & Delmas, P. D. (2006). The role of collagen in bone strength. *Osteoporos Int*, 17(3), 319-336. doi: 10.1007/s00198-005-2035-9
- Villarreal, A., Stoecker, B., Garcia, C., Garcia, K., Rios, R., Gonzales, C., . . . Deyhim, F. (2007). Cranberry juice improved antioxidant status without affecting bone quality in orchidectomized male rats. *Phytomedicine*, 14(12), 815-820.
- Von Bingen, H. (1158). *Hildegard von Bingen's Physica, The complete English Translation of Her Classic Work on Health and Healing* (P. Throop, Trans. H. A. Press Ed.).
- Wang, X., Shen, X., Li, X., & Agrawal, C. M. (2002). Age-related changes in the collagen network and toughness of bone. *Bone*, 31(1), 1-7.
- Wesseling-Perry, K. (2014). The BRC canopy: an important player in bone remodeling. *Am J Pathol*, 184(4), 924-926. doi: 10.1016/j.ajpath.2014.01.004
- Wheater, G., Elshahaly, M., Tuck, S. P., Datta, H. K., & van Laar, J. M. (2013). The clinical utility of bone marker measurements in osteoporosis. *J Transl Med*, 11, 201. doi: 10.1186/1479-5876-11-201
- White, D. J., Puranen, S., Johnson, M. S., & Heino, J. (2004). The collagen receptor subfamily of the integrins. *Int J Biochem Cell Biol*, 36(8), 1405-1410. doi: 10.1016/j.biocel.2003.08.016
- Wu, J., Fujioka, M., Sugimoto, K., Mu, G., & Ishimi, Y. (2004). Assessment of effectiveness of oral administration of collagen peptide on bone metabolism in growing and mature rats. *J Bone Miner Metab*, 22(6), 547-553. doi: 10.1007/s00774-004-0522-2

- Xiao, X., Liao, E., Zhou, H., Dai, R., Yuan, L., & Wu, X. (2005). Ascorbic acid inhibits osteoclastogenesis of RAW264. 7 cells induced by receptor activated nuclear factor kappaB ligand (RANKL) in vitro. *Journal of endocrinological investigation*, 28(5), 253-260.
- Xing, W., Pourteymoor, S., & Mohan, S. (2011). Ascorbic acid regulates osterix expression in osteoblasts by activation of prolyl hydroxylase and ubiquitination-mediated proteosomal degradation pathway. *Physiological genomics*, 43(12), 749-757.
- Xu, Y., Han, X., & Li, Y. (2010). Effect of marine collagen peptides on long bone development in growing rats. *J Sci Food Agric*, 90(9), 1485-1491. doi: 10.1002/jsfa.3972
- Yamada, S., Nagaoka, H., Terajima, M., Tsuda, N., Hayashi, Y., & Yamauchi, M. (2013). Effects of fish collagen peptides on collagen post-translational modifications and mineralization in an osteoblastic cell culture system. *Dent Mater J*, 32(1), 88-95.
- Yamada, S., Yoshizawa, Y., Kawakubo, A., Ikeda, T., Yanagiguchi, K., & Hayashi, Y. (2013). Early gene and protein expression associated with osteoblast differentiation in response to fish collagen peptides powder. *Dent Mater J*, 32(2), 233-240.
- Yamauchi, M., & Sricholpech, M. (2012). Lysine post-translational modifications of collagen. *Essays Biochem*, 52, 113-133. doi: 10.1042/bse0520113
- Yeh, I.-T. (2007). Postmenopausal hormone replacement therapy: endometrial and breast effects. *Advances in anatomic pathology*, 14(1), 17-24.
- Yi, H.-S., Choi, B., & Lee, S. (2011). Molecular Understanding and Assessment of Hypoparathyroidism. *Endocrinol Metab*, 26(1), 25-32.
- Yu, E. W., Neer, R. M., Lee, H., Wyland, J. J., de la Paz, A. V., Davis, M. C., . . . Finkelstein, J. S. (2011). Time-dependent changes in skeletal response to teriparatide: escalating vs. constant dose teriparatide (PTH 1-34) in osteoporotic women. *Bone*, 48(4), 713-719. doi: 10.1016/j.bone.2010.11.012
- Yun, J. H., Kim, C. S., Cho, K. S., Chai, J. K., Kim, C. K., & Choi, S. H. (2007). (-) - Epigallocatechin gallate induces apoptosis, via caspase activation, in osteoclasts differentiated from RAW 264.7 cells. *Journal of periodontal research*, 42(3), 212-218.
- Zallone, A. (2006). Direct and Indirect Estrogen Actions on Osteoblasts and Osteoclasts. *Ann N Y Acad Sci*, 1068(1), 173-179. doi: 10.1196/annals.1346.019
- Zhang, J., Munger, R. G., West, N. A., Cutler, D. R., Wengreen, H. J., & Corcoran, C. D. (2006). Antioxidant intake and risk of osteoporotic hip fracture in Utah: an effect modified by smoking status. *Am J Epidemiol*, 163(1), 9-17. doi: 10.1093/aje/kwj005



ANNEXES

Abréviations

1,25(OH)₂D₃ 1,25-hydroxyvitamine D₃

A

AGE Produits de la glycation
Ala Alanine
ALP Phosphatase alcaline
ANC Apports Nutritionnels Conseillés
Arg Arginine
Asp Asparagine
ATP Adénosine-5'-Triphosphate

B

bALP isoenzyme osseuse de la phosphatase alcaline
BHC Bovine Hydrolyzed Collagen (Collagène hydrolysé bovin)
BMP Bone Morphogenetic Protein
BMU Basic Multicellular Unit ou Unités de Remodelage Osseux
BRC Bone Remodeling Compartment
BSA Albumine de serum bovin
BSP Bone Sialoprotein

C

Ca²⁺ ion Calcium
CatK Cathépsine K
CSF-1 Colony stimulatig Facor 1
CTX Téloptide c-terminal du collagène de type I

D

DXA Dual X-Ray Absorptiometry (Absorptiométrie biphotonique à rayon X)
DMO Densité Minérale Osseuse
DPD Liaisons désoxypyridinoline

E

ER Récepteur aux oestrogènes
ERK1/2 Extracellular Signal-Related Kinase

F

FAK Focal Adhesion Kinase
FasL Ligand de la protéine Fas
FHC Collagène hydrolysé de poisson
FRAX Evaluation du risque de fracture

G

Glu Glutamate
Gly Glycine

H

HC Collagène hydrolysé
Hyl Hydroxylysine
Hyp Hydroxyproline

I

IGF-1 Insulin Growth Factor
IL Interleukine
INSEE Institut National de la Statistique et des Etudes Economiques

L

Lys Lysine

M

MMP Métalloprotéinase matricielle
MSC Cellules souches mésenchymateuses

N

NCPs Protéines non collagéniques
NTX Téloptide N-terminal du collagène de type I

O

OB Ostéoblastes
OC Ostéoclastes
OMS Organisation Mondiale de la Santé
OPG Ostéoprotégérine
OSX Ostérix
OVX Rongeurs ovariectomisés

P

Pi Phosphate inorganique
PICP Propeptide C-terminal du collagène de type I
PINP Propeptide N-terminal du collagène de type I
PHC Collagène hydrolysé de porc
PPi Pyrophosphate inorganique
Pro Proline
PTH Hormone parathyroïdienne ou parathormone
PYD Liaison Pyridinoline

R

RANK Receptor Activator Nuclear Factor K B
RANKL Receptor Activator Nuclear Factor K B Ligand
RER Réticulum Endoplasmique Rugueux

T

TLDA TaqMan® Low Density Array
TRAP Phosphatase acide tartrate résistance
TRAP 5b Phosphatase acide tartrate résistante isoenzyme 5b

V

VD2 Ergocalciférol
VD3 Cholecalciférol

Liste des illustrations

Figure 1 : Incidence de fractures vertébrales, fémorales et du poignet selon l'âge et le sexe

Figure 2 : Distribution de la prévalence de l'ostéoporose au sein de l'Union Européenne

Figure 3 : Détermination de la DMO et du T-score lors d'une ostéodensitométrie

Figure 4 : Illustration schématique du processus de minéralisation

Figure 5 : Devenir des cellules souches mésenchymateuses

Figure 6 : Contrôle de la différenciation ostéoblastique et apparition de marqueurs ostéoblastiques

Figure 7 : Illustration d'ostéocytes emmurés dans la matrice osseuse

Figure 8 : Différenciation des ostéoclastes

Figure 9 : Mécanisme de la résorption ostéoclastique

Figure 10 : Remodelage osseux au sein d'une Unité de Remodelage

Figure 11 : Cycle de remodelage osseux

Figure 12 : Représentation schématique du signal bidirectionnel émis par l'éhrine B2 (ostéoclaste) et l'éphrine B4 (précurseur des ostéoclastes)

Figure 13 : Régulation de la communication ostéoblastes/ostéoclastes à travers la triade cytokinique

Figure 14 : Régulation schématique de l'homéostasie phosphocalcique par la vitamine D, l'hormone parathyroïdienne et la calcitonine

Figure 15 : Modèle de l'équilibre du calcium

Figure 16 : Régulation de l'homéostasie calcique par l'hormone parathyroïdienne et la calcitonine

Figure 17 : Modèle d'action des oestrogènes sur les cellules osseuses lors de la ménopause basé sur l'hypothèse de Nakamura et al. 2007

Figure 18 : Pic de masse osseuse

Figure 19 : Mécanisme d'action des traitements disponibles pour l'ostéoporose

Figure 20 : Effet de l'ingestion de protéines sur la production d'IGF-1

Figure 21 : La triple hélice de collagène

Figure 22 : Schéma illustrant les liaisons hydrogènes trouvées à l'intérieur de la triple hélice

Figure 23 : Biosynthèse du collagène de type I

Figure 24 : Représentation schématique de l'assemblage de fibrilles de collagène en quinconce

Figure 25 : Formation de liaisons croisées lors de l'assemblage de molécules de collagène en fibrilles

Figure 26 : Mécanisme de dégradation du collagène.

Figure 27 : Communication entre l'ostéoblaste et la matrice extracellulaire (ostéoïde)

Figure 28 : Différentes orientations des fibres de collagène

Figure 29 : Représentation schématique de notre démarche scientifique

Figure 30 : Comparaison d'images de fémurs

Liste des communications

Communications orales :

A. Daneault, Véronique Fabien-Soulé, V. Coxam et Y. Wittrant. **APPROCHES INTEGREES DE LA DETERMINATION DE FRACTIONS DE COLLAGENE HYDROLYSE SUR LA SANTE OSSEUSE.** *Journées des Doctorants 2012, Clermont-Ferrand, Septembre 2012.*

A. Daneault, V. Coxam, V. Fabien-Soulé, J. Prawitt, et Y. Wittrant. **HYDROLYZED COLLAGEN PROMOTES OSTEOBLASTOGENESIS AND PRESERVES BONE MASS IN OVARIETOMIZED MICE.** *XVIIème Journées Françaises de la Biologie des Tissus Minéralisés. Super Besse, Février 2015.*

Posters :

A. Daneault, V. Coxam, V. Fabien-Soulé et Y. Wittrant. **HYDROLYZED COLLAGEN PROMOTES OSTEOBLAST DIFFERENTIATION IN VITRO AND BONE HEALTH IN OVARIETOMIZED MICE.** *World Congress on Osteoarthritis (OARSJ), Paris, Avril 2014.*

A. Daneault, V. Coxam, V. Fabien-Soulé, J. Prawitt, et Y. Wittrant. **INFLUENCE DU COLLAGÈNE HYDROLYSE SUR LA SANTE OSSEUSE.** *Journées de l'Ecole Doctorale, Clermont-Ferrand, Mai 2015.*

A. Daneault, V. Coxam, V. Fabien-Soulé et Y. Wittrant. **HYDROLYZED COLLAGEN PROMOTES OSTEOBLASTOGENESIS AND PRESERVES BONE MASS IN OVARIETOMIZED MICE.** *International Osteoporosis Foundation Congress, Séville, Avril 2014.*

Résumé

Les conséquences de l'évolution démographique vers une population de plus en plus âgée ont un impact énorme sur l'économie en termes de santé. Vieillir en bonne santé est devenu un enjeu majeur et il est devenu primordial d'instaurer des politiques de prévention. La nutrition apparaît comme l'une des stratégies préventives les plus prometteuses pour contrer la perte de masse osseuse liée à l'âge. Le couple Calcium/vitamine D ayant des effets limités, il est important de développer d'autres alternatives afin de préserver le capital osseux.

L'étude de l'effet du collagène hydrolysé (HC) sur le tissu osseux est devenue une thématique montante ces dernières années. Plusieurs études *in vivo* ont permis de démontrer que l'ingestion de collagène hydrolysé améliorait le développement de la masse osseuse. L'objectif de cette thèse a été d'étudier la pertinence de l'utilisation du HC dans la mise au point de stratégies nutritionnelles pour la prévention de l'ostéoporose.

Après avoir mis en évidence l'intérêt du HC sur l'activité d'ostéoblastes murins MC3T3-E1, nous avons évalué son effet *in vivo* sur des souris ovariectomisées : modèle d'ostéoporose post-ménopausique liée à une carence oestrogénique. Nous avons montré que le collagène hydrolysé d'origine bovine (BHC) contribue à limiter la perte osseuse induite par l'ovariectomie. Cette étude *in vivo* nous a permis de constater que la limitation de la perte osseuse induite est liée à un effet spécifique du BHC et dépendante de la longueur du peptide.

La deuxième partie de nos travaux a consisté à mettre en lumière le rôle des métabolites de collagène sur l'activité des cellules osseuses. Ainsi, le BHC favorise la survie et la différenciation ostéoblastique et inversement pour les ostéoclastes en modulant le ratio OPG / RANKL.

En résumé, nos résultats confirment le potentiel du collagène hydrolysé dans la prise en charge de la perte osseuse liée à l'âge et soulignent l'intérêt du collagène hydrolysé dans la conception de stratégies novatrices pour le management des troubles ostéoporotiques.