

UNIVERSITE DU DROIT ET DE LA SANTE DE LILLE 2

FACULTE DE CHIRURGIE DENTAIRE

2014

N°:

THESE

pour le

DIPLOME D'ETAT

DE DOCTEUR EN CHIRURGIE DENTAIRE

Présentée et soutenue publiquement le 01 juillet 2014

Par COUTEL Xavier

Né le 31 mai 1988

Impact de l'acide zolédronique sur la qualité osseuse

**Approche expérimentale de la composition osseuse
mandibulaire par microspectrométrie Raman.**

JURY

Président : Professeur Guillaume PENEL

Assesseurs : Docteur Yves BAILLEZ

Docteur Béatrice LOUVET

Docteur Cécile OLEJNIK

Membre invité : Docteur Marie-Anne ELSERMANS - COGNET

ACADEMIE DE LILLE

UNIVERSITE DU DROIT ET DE LA SANTE LILLE 2

-*-*-*-*-*-*-*-*-*

FACULTE DE CHIRURGIE DENTAIRE

PLACE DE VERDUN

59000 LILLE

-*-*-*-*-*-*-*-*-*

Président de l'Université : X. VANDENDRIESSCHE
Secrétaire Général de l'Université : P.M. ROBERT
Doyen : P.H. DUPAS
Assesseurs : H. BOUTIGNY et J.M. LANGLOIS
Chef des Services Administratifs : J.C. LOUCHE

PERSONNEL ENSEIGNANT DE L'U.F.R.

PROFESSEURS DES UNIVERSITES :

P.H. DUPAS : Doyen de la Faculté
Responsable de la Sous-section de Pédodontie
E. DELCOURT-DEBRUYNE : Responsable de la Sous-section de Parodontologie
E. DEVEAUX : Responsable de la Sous-section d'Odontologie
Conservatrice – Endodontie
G.PENEL : Sciences Biologiques

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES

Y. BAILLIEZ	: Responsable de la Sous-section Sciences Biologiques
P. BEHIN	: Prothèses
F. BOSCHIN	: Parodontologie
H. BOUTIGNY	: Parodontologie
C. CATTEAU	: Prévention, Epidémiologie, Economie de la Santé, Odontologie Légale
A. CLAISSE	: Odontologie Conservatrice – Endodontie
T. COLARD	: Sciences Anatomiques et Physiologiques, Occlusodontiques, Biomatériaux, Biophysique, Radiologie
M. DANGLETERRE	: Sciences Biologiques
Th. DELCAMBRE	: Prothèses
C. DELFOSSE	: Pédodontie
F. DESCAMP	: Prothèses
A. DEVILLERS	: Responsable de la Sous-section Prévention, Epidémiologie, Economie de la Santé, Odontologie Légale
A. GAMBIEZ	: Odontologie Conservatrice – Endodontie
F. GRAUX	: Prothèses
P. HILDELBERT	: Odontologie Conservatrice – Endodontie
J.M. LANGLOIS	: Responsable de la Sous-section Chirurgie Buccale, Pathologie et Thérapeutique, Anesthésiologie et Réanimation
Cl. LEFEVRE	: Prothèses
J.L. LEGER	: Orthopédie Dento-Faciale et Orthodontie
M. LINEZ	: Odontologie Conservatrice – Endodontie
G. MAYER	: Prothèses
E. MOREAU-BOCQUET	: Responsable de la Sous-section Orthopédie Dento- Faciale et Orthodontie
L. NAWROCKI	: Chirurgie Buccale, Pathologie et Thérapeutique, Anesthésiologie et Réanimation
B. PICART	: Responsable de la Sous-section Prothèses Chef du Service d'Odontologie du CHRU de Lille
P. ROCHER	: Sciences Anatomiques et Physiologiques, Occlusodontiques, Biomatériaux, Biophysique, Radiologie
M. SAVIGNAT	: Responsable de la Sous-Section Sciences Anatomiques et Physiologiques, Occlusodontiques, Biomatériaux, Biophysique, Radiologie
T. TRENTESAUX	: Pédodontie
J. VANDOMME	: Prothèses

Réglementation de présentation du mémoire de Thèse

Par délibération en date du 29 octobre 1998, le Conseil de la Faculté de Chirurgie Dentaire de l'Université de Lille 2 a décidé que les opinions émises dans le contenu et les dédicaces des mémoires soutenus devant jury doivent être considérées comme propres à leurs auteurs, et qu'ainsi aucune approbation, ni improbation ne leur est donnée.

Aux membres du jury....

Monsieur le Professeur Guillaume PENEL
Professeur des Universités - Praticien Hospitalier
Sous-Section Sciences Biologiques

Docteur en Chirurgie Dentaire
Doctorat de l'Université René DESCARTES (Paris V)
C.E.S d'Odontologie Chirurgicale
Habilité à Diriger des Recherches

Monsieur le Président,

Vous me faites l'honneur de présider ce jury et je vous en remercie. Professeur passionné et passionnant, rigoureux et exigeant, vous vous êtes également montré très disponible et quelques fois même blagueur ! Je tiens à vous remercier chaleureusement de m'avoir fait confiance en m'accueillant à nouveau au sein du laboratoire PMOI et en créant un environnement stimulant et rempli d'opportunités. Merci notamment de m'avoir associé aux différents projets scientifiques du laboratoire, à l'interface de nombreuses disciplines : c'est ce qui m'a indéniablement donné un goût et une motivation pour transformer ma première expérience d'initiation à la recherche en une expérience d'épanouissement intellectuelle à travers elle.

Monsieur le Docteur Yves BAILLIEZ
Maître de Conférences des Universités - Praticien Hospitalier des CSERD
Sous-Section Sciences Biologiques

Docteur en Chirurgie Dentaire
Docteur de l'Université de Lille 2
Lauréat de l'Académie Nationale de Chirurgie Dentaire
Responsable de la Sous-section Sciences Biologiques

Je tiens à vous remercier d'avoir accepté de siéger dans mon jury de thèse et de contribuer à l'évaluation de ce travail en m'apportant vos précieuses connaissances en sciences biologiques. Investi pour valoriser l'accès des étudiants en odontologie à la recherche et à l'enseignement, vous avez largement contribué à me faire partager cette passion pour la transmission du savoir et la relation à l'autre. Veuillez trouver, dans ce travail, l'assurance de ma profonde reconnaissance.

Madame le Docteur Béatrice LOUVET

Chargée d'Enseignement

Sous-Section de Chirurgie Buccale, Pathologie, Thérapeutique Dentaire

Ancienne Assistante Hospitalo-Universitaire

Odontologiste Assistant des Services de Consultations et de Traitements Dentaires

Docteur en Chirurgie Dentaire

Maîtrise des Sciences Biologiques et Médicales

D.E.A des Sciences de la Vie et de la Santé

D.U de Criminalistique - Paris V

D.U de Réparation Juridique du Dommage Corporel - Paris V

D.U de Dermatologie-Vénérologie de la muqueuse buccale

Master II de Droit de la Santé appliqué à l'Expertise en Odonto-Stomatologie

Expert près la Cour d'Appel de Douai

Je tiens à vous exprimer ma gratitude pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse en qualité de rapporteur et de juger ce travail sur une thématique d'actualité : l'impact des bisphosphonates sur le tissu osseux à l'échelle moléculaire. Je tiens également à vous remercier pour votre enseignement riche et stimulant. Je garde un très bon souvenir de mes vacances cliniques à vos côtés notamment grâce à votre pédagogie, votre accessibilité et votre spontanéité ainsi que votre souci d'entretenir des relations inter-personnelles chaleureuses et humaines avec, en plus, une bonne humeur communicative.

Madame le Docteur Cécile OLEJNIK

Chargée d'Enseignement

Sous-Section Sciences Biologiques

Ancienne Assistante Hospitalo-Universitaire

Docteur en Chirurgie Dentaire

Master II Recherche, Spécialité Biologie Cellulaire et Biologie Quantitative

Merci d'avoir relevé le défi en acceptant d'encadrer mon travail de thèse. Je te remercie pour ta grande et très appréciée disponibilité tout au long de cette année avec un emploi du temps pourtant très chargé; j'en ai pleinement conscience. Je te remercie également pour ton aide précieuse à la réalisation finale de ce travail et pour ton soutien tout au long de celui-ci. Pour ces principales raisons et qualités, je te souhaite le meilleur dans la concrétisation de tes projets et espère sincèrement que le futur apportera d'autres opportunités de travailler ensemble.

Madame le Docteur Marie-Anne COGNET-ELSERMANS
Assistante Hospitalo-Universitaire des CSERD
Sous-Section Sciences Biologiques

Docteur en Chirurgie Dentaire

Tout d'abord, merci beaucoup pour ta présence au sein de mon jury de thèse. Je te suis très reconnaissant de m'avoir accompagné durant cette année et de m'avoir fait partager ton expérience d'enseignement dans le cadre des travaux dirigés. J'ai beaucoup apprécié les pauses « boissons chaudes » quasi-quotidiennes et les discussions qu'elles ont occasionnées. Merci infiniment pour ta gentillesse et pour m'avoir transmis ta passion pour tout ce qui fait que la vie a du « mordant » !

Je dédie cette thèse....

- Table des matières -

Liste des abréviations.....	p. 15
-----------------------------	-------

Partie 1

ETAT DE L'ART : BISPHOSPHONATES ET QUALITE OSSEUSE.....	p. 16
--	--------------

<u>Chapitre 1</u> : Le tissu osseux: un tissu composite, dynamique et doté d'une structure hiérarchisée complexe.....	p.17
--	-------------

1.	Rappels histophysiologiques sur le tissu osseux.....	p.17
	A. Introduction.....	p.17
	B. Cellules osseuses.....	p.17
	C. Matrice extra-cellulaire.....	p.18
	a) Matrice organique osseuse.....	p.18
	Trame collagénique.....	p.19
	b) Matrice inorganique osseuse.....	P.21
	Composition et structure du minéral osseux.....	p.21
	Croissance et maturation du cristal d'apatite.....	p.22
	Caractéristiques principales du cristal d'apatite.....	p.23
	c) Relation entre la matrice collagénique et la minéralisation.....	p.24
	Nucléation cristalline.....	p.24
	Front de minéralisation.....	p.25
2.	Physiologie du remodelage osseux.....	p.26
	A. Différentes étapes du remodelage osseux et facteurs régulateurs.....	p.26
	B. Maturité minérale osseuse corticale et trabéculaire.....	p.28
3.	Quid de la qualité osseuse et ses déterminants ?	p.29
	A. Approche multi-échelle du tissu osseux : les différents niveaux d'organisation structureaux du tissu osseux	p.29
	B. Concept de qualité osseuse.....	p.31
	C. Déterminants de la qualité osseuse et moyens d'évaluation	
	a) Echelle macroscopique.....	p.31
	Géométrie osseuse (taille, épaisseur).....	p.31

b) Echelle microscopique.....	p.32
Microarchitecture osseuse.....	p.32
c) Echelle moléculaire.....	p.33
Composition et structure osseuses.....	p.33

Chapitre 2 : Les bisphosphonates (BPs).....p.35

1. Généralités - Classification chimique des principaux BPs.....	p.35
2. Principales propriétés connues des BPs.....	p.37
3. Mécanismes d'action des BPs.....	p.39
A. Aspects tissulaires.....	p.39
B. Aspects cellulaires.....	p.39
4. Effets des BPs sur la qualité osseuse.....	p.40
A. Effets sur le remodelage, la microarchitecture et l'accumulation de microcracks.....	p.40
B. Effets sur la minéralisation.....	p.41
C. Effets sur la composition et la structure osseuse.....	p.41
5. Objectifs des travaux de thèse.....	p.42

Partie 2

APPROCHE EXPERIMENTALE : IMPACT A COURT TERME DE L'ACIDE ZOLEDRONIQUE SUR LA QUALITE OSSEUSE MANDIBULAIRE A L'ECHELLE MOLECULAIRE CHEZ LE RAT.....p.43

1. Contexte de l'étude.....	p.44
2. Matériel et méthodes.....	p.46
A. Protocole expérimental : modèle animal.....	p.46
B. Echantillon osseux : inclusion et réalisation des lames minces.....	p.47
C. Microscope confocal à balayage laser.....	p.47

D.	Microspectromètre Confocal Raman.....	p.49
a)	Principes et paramètres d'acquisition.....	p.49
b)	Pré-traitement.....	p.50
E.	Paramètres physico-chimiques.....	p.50
F.	Analyses statistiques.....	p.52
3.	Résultats.....	p.53
A.	Microscopie confocale à balayage laser.....	p.53
B.	Paramètres physico-chimiques.....	p.54
a)	Description spectrale et attribution de bandes.....	p.54
b)	Evaluation de la comparaison osseuse entre les 2 groupes S et ZA : effet de l'administration de ZA.....	p.55
c)	Evaluation de la composition osseuse en fonction de l'âge tissulaire : effet de la maturation du tissu osseux.....	p.56
d)	Evaluation de la composition osseuse entre les sites alvéolaire et basal : effet de la microarchitecture et de la physiologie locale..	p.56
4.	Discussion.....	p.59
5.	Conclusion et perspectives.....	p.61
	Conclusion générale.....	p.62
	Références bibliographiques.....	p.63
	Table des illustrations.....	p.68

Liste des abréviations

AA	: Acide aminé
BMD	: Bone mass Densitometry
BMPs	: Bone Morphogénic Proteins
BPs	: Bisphosphonates
BSP	: Bone Sialo-Protein
μCT	: X-Ray Computed Microtomography
deH-DHLNL	: deHydroxy-DiHydroLisinoNorLeucine
DEXA	: Dual Energy X-ray Absorptiometry
EDX	: Energy Dispersive X-ray spectroscopy
FTIR	: Fourier Transform InfraRed spectroscopy
HR-pQCT	: High Resolution Peripheral Quantitative Computed Tomography
IFN	: Interféron
IR	: Infra-rouge
IRM-HR	: Imagerie par Résonance Magnétique - Haute Résolution
MEB	: Microscopie Electronique à Balayage
MEC	: Matrice Extra-Cellulaire
OB	: Ostéoblaste
OC	: Ostéoclaste
OCN	: Ostéocalcine
ON	: Ostéonectine
ONM	: Ostéonécrose des Maxillaires
OPG	: Ostéoprotégérine
OPN	: Ostéopontine
PPi	: Pyrophosphate inorganique
PG	: Protéoglycans
PMMA	: Polyméthylmétacrylate
Pyr	: Pyridinoline
qBEI	: Quantitative Backscattering Energy Imaging
QCT	: Quantitative Computed Tomography
RANK	: Récepteur Activateur du NF-KappaB
RANKL	: Ligand de RANK
RMN	: Résonance Magnétique Nucléaire
TNF	: Tumor Necrosis Factors
⁹⁹ Tc	: Technetium

Partie 1

- ETAT DE L'ART : BISPHOSPHONATES ET QUALITE OSSEUSE -

Le tissu osseux présente des fonctions, une composition ainsi qu'un renouvellement permanent qui lui sont caractéristiques et que nous détaillerons dans un premier temps. Les maladies osseuses liées au dérèglement de ce renouvellement et aboutissant à une fragilisation osseuse sont nombreuses. Les stratégies thérapeutiques actuelles liées à celles-ci sont basées sur des agents pharmacologiques anabolisants, catabolisants ou découplants du tissu osseux avec pour cible principale les cellules chefs d'orchestre de ce remodelage. Nous focaliserons notre attention sur un traitement anti-résorptif en particulier, - les bisphosphonates - qui sont parmi les agents thérapeutiques les plus administrés pour ces pathologies.

Nous détaillerons, dans un deuxième temps, la structure et le mécanisme d'action de ces derniers en précisant l'exemple du zolédronate utilisé dans l'étude. Les bisphosphonates ont permis d'élargir le champ des connaissances sur le tissu osseux. La faible corrélation entre l'augmentation de la densité minérale osseuse observée sous traitement et la diminution du risque fracturaire a conduit à penser que la résistance osseuse n'était pas exclusivement expliquée par l'aspect quantitatif. Le concept de "qualité osseuse" a émergé avec l'idée selon laquelle l'effet des bisphosphonates pourrait être décomposé en un effet positif à l'échelle de l'organe, à savoir une augmentation de la densité minérale osseuse conduisant à la diminution du risque de fracture; mais que cet effet prépondérant pourrait être accompagné de modifications de la qualité osseuse tissulaire et sub-tissulaire. Nous testerons cette hypothèse dans une 2^{ème} partie par une approche expérimentale.

Chapitre 1 - Le tissu osseux : un tissu composite, dynamique et doté d'une structure hiérarchisée complexe

1. Rappels histophysiologiques sur le tissu osseux

A. Introduction

Le tissu osseux est un tissu conjonctif spécialisé qui compose le squelette et qui se caractérise par la nature solide (minéralisée) de sa Matrice Extra-Cellulaire (MEC), représentant ~ 90% du volume osseux.

Le tissu osseux a 3 grandes fonctions :

1. une fonction mécanique avec un rôle de soutien du corps et de protection des organes mais également de mobilité en association avec les muscles squelettiques.
2. une fonction métabolique, via un remodelage permanent tout au long de la vie, qui entretient l'homéostasie phosphocalcique. L'os est une banque de minéraux contenant plus de 98% du calcium, 85% du phosphore, 80% des carbonates et entre 40 à 60% du sodium et du magnésium de l'organisme.
3. une fonction hématopoïétique grâce à la moelle qui représente le siège de synthèse des cellules sanguines et de stockage des cellules stromales médullaires, multipotentes.

B. Cellules osseuses

Le tissu osseux contient 4 types de cellules différenciées et fonctionnalisées qui lui sont propres :

- Les ostéoblastes (OB), les ostéocytes et les cellules bordantes sont les cellules ostéoformatrices.
- Les ostéoclastes (OC) sont ostéorésorbants.

Contrairement aux cellules ostéoformatrices qui dérivent de cellules souches mésenchymateuses pluripotentes, les OC dérivent de la lignée hématopoïétique monocyttaire. Les OB, les OC et les cellules bordantes de l'os se trouvent à la surface des plages de tissu osseux, alors que les ostéocytes sont situés à l'intérieur de la matrice osseuse.

Les ostéocytes, cellules majoritaires (90% des cellules osseuses), sont des OB différenciés siégeant dans des logettes (ostéoplastes) et sont entièrement emmurés par la MEC osseuse minéralisée. Ils communiquent avec la périphérie et gardent un contact avec les cellules à la surface de l'os grâce à un réseau canaliculaire. Si le rôle des ostéocytes est resté longtemps énigmatique, l'avancée des connaissances sur le dialogue cellulaire au sein du tissu osseux a permis de lui attribuer, de manière consensuelle, un rôle mécanosenseur et modulateur dans l'homéostasie tissulaire.

C. Matrice extra-cellulaire

La MEC osseuse est assimilable à un matériau composite avec une phase organique (~30-35% du poids osseux total), un compartiment minéral (~65% du poids osseux total) et de l'eau (5 à 10% du poids osseux total). Ces composants confèrent au tissu osseux des propriétés caractéristiques (biomécaniques et métaboliques) propres et contribuent ainsi à son intégrité structurale.

a) La matrice organique osseuse

Véritable charpente dynamique et fonctionnelle, la MEC osseuse organique est composée :

- principalement (~ 90%) de collagène fibrillaire (de type I essentiellement).
- de phospholipides et autres protéines non collagéniques telles que :
 - les protéoglycanes (PG) - médiateur des interactions matrice-cellules ;
 - l'ostéonectine (ON) - stimulateur de la formation osseuse, elle intervient dans la minéralisation par son affinité pour le collagène de type I et le Ca^{2+} ;
 - l'ostéocalcine (OCN) - marqueur des ostéoblastes matures, elle régule l'activité des ostéoclastes et de leurs précurseurs, intervient dans la minéralisation et joue un possible rôle dans la phase d'inversion lors du remodelage osseux.

Elle contient également d'autres protéines non collagéniques phosphorylées, nommées SIBLINGs pour "Small Integrin-Binding LIgand, N-linked Glycoprotéins", en particulier :

- l'ostéopontine (OPN) : reliant l'hydroxy-apatite aux cellules osseuses ;
- et les sialoprotéines osseuses (BSP) : jouant un rôle dans le remodelage et la minéralisation osseuse.

La MEC possède aussi des cytokines (interleukines, facteurs de croissance, TNF, IFN...), facteurs solubles locaux de régulation du couplage du remodelage osseux et de la différenciation des cellules osseuses - sécrétés par les ostéoblastes. Ces cytokines jouent un rôle fondamental dans la régulation du remodelage du tissu osseux et de la minéralisation de la MEC.

Cette composition confère au tissu osseux sa ductilité, autrement dit sa capacité à absorber de l'énergie sans se rompre.

Trame collagénique

Le collagène de type I, le plus largement représenté dans le tissu osseux, est un hétérodimère composé de 3 chaînes polypeptidiques, 2 chaînes de type α_1 et 1 chaîne α_2 . Chaque chaîne porte la répétition du triplet d'AA (Gly-X-Y) où X correspond fréquemment à la proline et Y à l'hydroxyproline. Cet assemblage de 3 chaînes est appelé *procollagène* et possède une structure en triple hélice dont les dimensions sont approximativement de 300 nm de longueur et 1,5 nm de diamètre (Figure 1). Le procollagène est assemblé à partir de l'enroulement des 3 chaînes α de l'extrémité C-terminale vers l'extrémité N-terminale dans le réticulum endoplasmique granuleux des ostéoblastes.

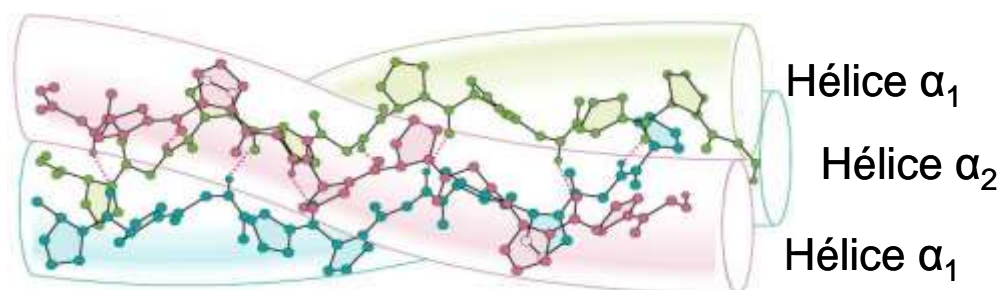


Figure 1 : Schéma représentatif de la conformation hélicoïdale du collagène

Les molécules de procollagène sont ensuite excrétées dans le milieu extra-cellulaire par des vésicules de sécrétion dans lesquelles vont débiter des modifications post-traductionnelles (hydroxylation, glycosylation...) [36]. Une fois excrétés, les propeptides C et N-terminaux sont scindés par des protéinases, le procollagène est alors appelé *tropocollagène*. Le propeptide N-terminal du collagène de type I (ou P1NP) est relargué dans la circulation et peut être dosé dans le sérum comme marqueur biologique de la formation osseuse (Figure 2). Ces fibrilles de tropocollagène s'associent ensuite pour former les fibres de collagène avec une périodicité axiale de 67nm. Cette

périodicité donne aux fibres de collagène l'apparence de bandes claires et sombres en microscopie électronique.

Les fibres de collagène sont stabilisées par des molécules de pontage intra- et interfibrillaire appelées "cross-links" ou liaisons croisées du collagène qui contribuent à la résistance mécanique de ces fibres. Ces liaisons croisées sont au départ divalentes de type "déhydroxy-dihydrolysinonorleucine" (deH-DHLNL), immatures, et sont transformées par condensation en liaisons croisées matures trivalentes de type "Pyridinoline" (Pyr) [25,37].

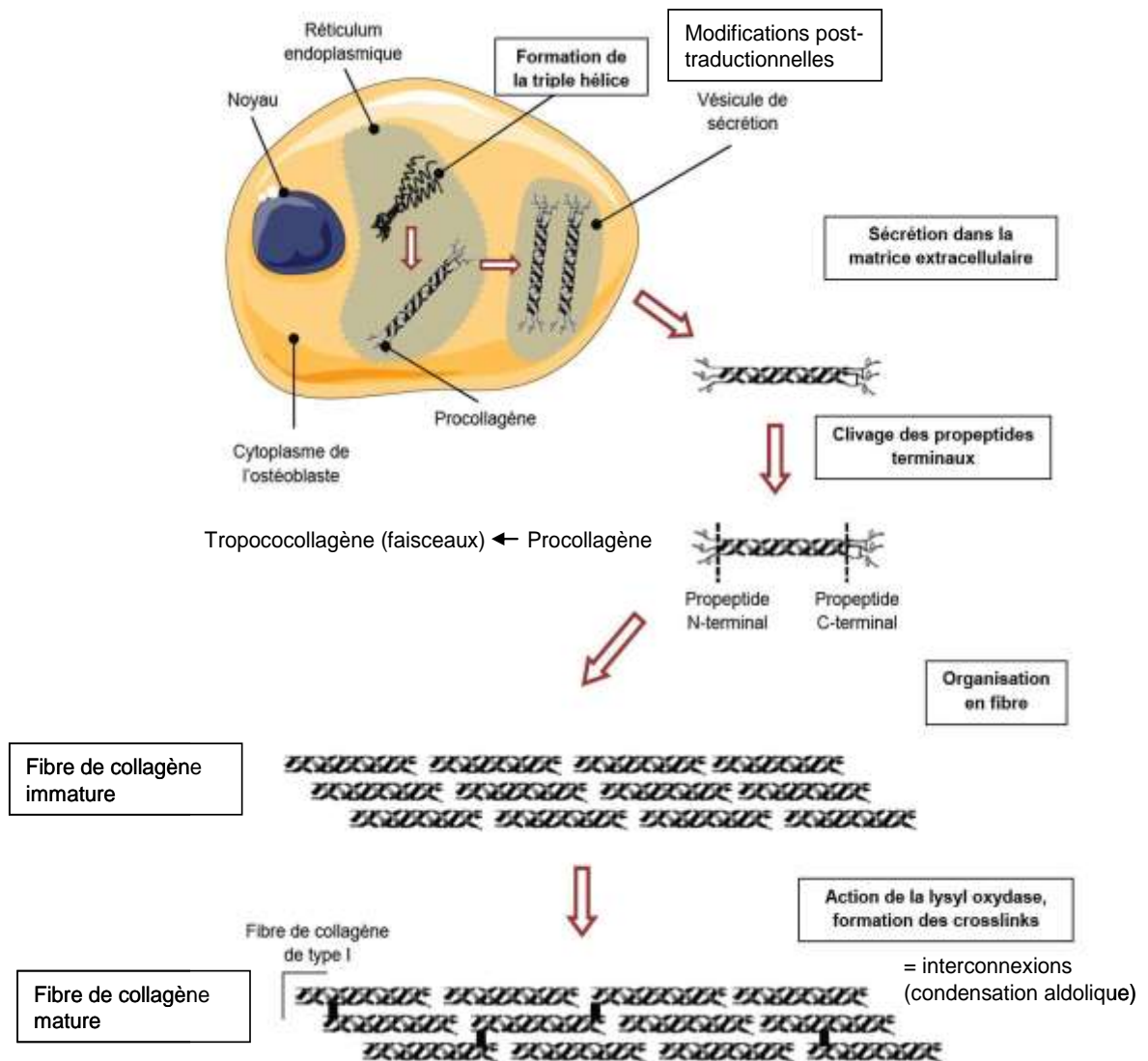


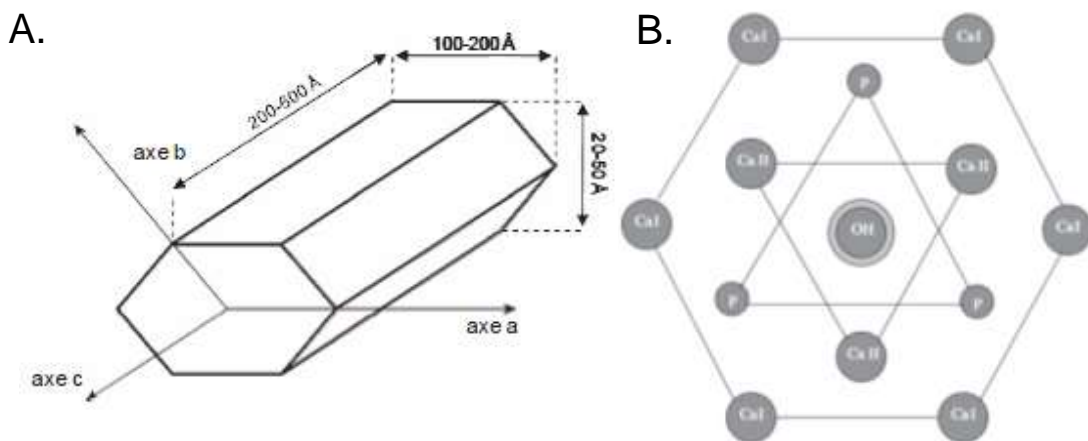
Figure 2 : Schéma des étapes intra- et extra-cellulaires de synthèse et de maturation du collagène (modifications post-traductionnelles), adapté de Myllyharju et Kivirikko, 2004 [47]

b) La matrice inorganique osseuse

Composition et structure du minéral osseux

On utilise souvent les apatites de synthèse de formule $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ pour la compréhension de l'organisation structurale et les substitutions des apatites biologiques [59]. L'appellation d'apatite biologique se réfère à un matériau apatitique nanocristallin et non stœchiométrique.

En effet, contrairement aux apatites de synthèse (parfaites), l'apatite biologique - retrouvée dans l'ensemble des tissus minéralisés de l'organisme : dentine, émail, os - est faiblement cristalline (environnement labile). Elle est caractérisée par la présence de nombreux ions étrangers à la composition théorique (fluor, strontium, baryum...). Un cristal de minéral osseux est constitué de la répétition d'une unité de base appelée "maille élémentaire" (Figure 3, A). La maille élémentaire est formée d'une quinzaine d'atomes et sa répétition dans les 3 dimensions constitue un réseau cristallin agencé dans un système hexagonal (Figure 3, B). Les 10 atomes de calcium occupent des sites distincts, notés Ca I et Ca II, qui forment des structures géométriques particulières autour des ions hydroxyles, un triangle pour les Ca II et un hexagone pour les Ca I. Ces 2 sites peuvent accueillir, par incorporation, différents ions de petite taille au voisinage du site des Ca I (Zn^{2+} , Mg^{2+} ...) et de plus grosse taille au voisinage du site des Ca II (Ba^{2+} , Sr^{2+} ...). Des substitutions ioniques sont aussi possibles au sein de l'apatite osseuse entre ses éléments constitutifs et des éléments extérieurs issus de l'environnement. [16]



**Figure 3: A. Représentation et dimensions du cristal d'apatite avec ses 3 axes de croissance
B. Structure cristalline de l'apatite osseuse montrant les 2 sites de fixation du calcium, d'après Bala [6].**

Les cristaux sont visibles en Microscopie Electronique à Balayage (MEB) entre les fibres de collagène et/ou à l'intérieur de celles-ci, sous la forme de petites plaques, filaments ou aiguilles (Figure 4).

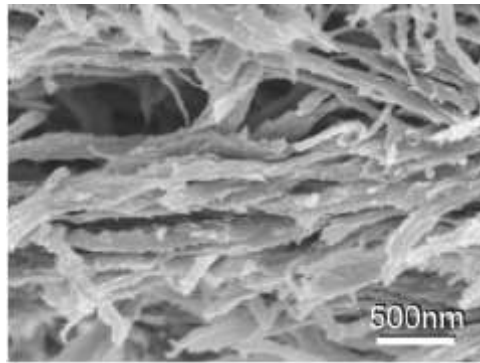


Figure 4 : Image en MEB de fibres de collagène (~ 1 μ de diamètre) minéralisée au sein d'un os trabéculaire humain (x10 000) - Paul Hansma Research Group

Croissance et maturation du cristal d'apatite

La croissance d'un cristal d'apatite est, tout d'abord, liée à la présence d'eau dans la matrice osseuse. En effet, pour augmenter sa taille, le cristal est tributaire de la diffusion des ions constitutifs du milieu. Si le contenu en eau est trop faible, les ions ne diffusent plus, les échanges ioniques sont alors impossibles et la croissance du cristal cesse.

L'observation *in vitro* de cristaux d'apatite synthétique en suspension a permis de caractériser 4 compartiments (Figure 5):

1. le fluide environnant dans lequel baigne le cristal;
2. la couche hydratée qui constitue la partie non apatitique du cristal. Elle contient de nombreux ions très labiles et réactifs facilitant les échanges. Elle permet de maintenir l'électro-neutralité entre le corps apatitique et le fluide environnant et favorise la nucléation;
3. la surface du cristal;
4. le corps apatitique.

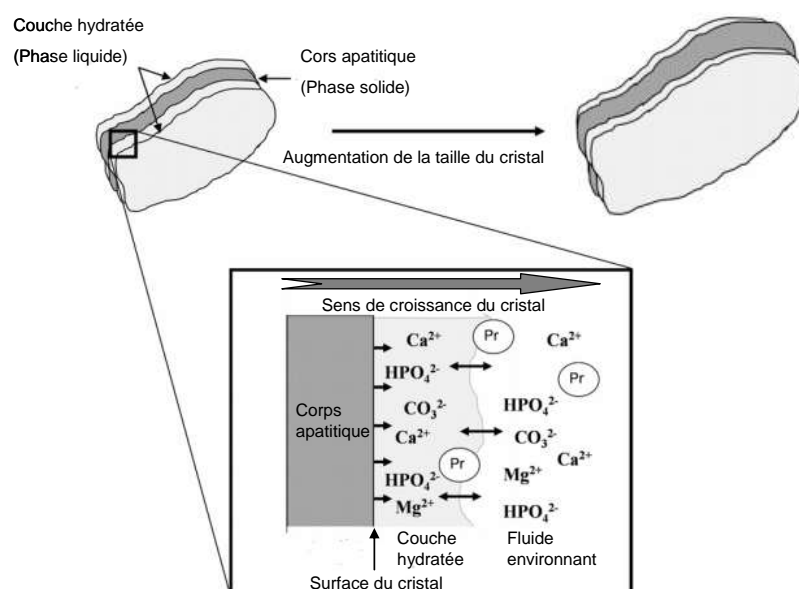


Figure 5 : Echanges ioniques intervenant entre les différents compartiments du cristal au cours de sa maturation, adapté de Cazalbou, 2005 [16] et Farlay, 2010 [26]

Le mécanisme de croissance (dans les 3 axes a, b et c) et de maturation du cristal d'apatite impliquent des échanges d'ions et de groupements protéiques chargés entre les différents compartiments, notamment à l'interface avec le cristal apatitique. Les ions Ca^{2+} et PO_4^{3-} situés en surface des cristaux participent à des échanges rapides avec le liquide interstitiel et donc avec le courant sanguin. Ainsi, au cours de la maturation physiologique, le domaine apatitique va croître au dépend du domaine non apatitique. Ce phénomène peut être quantifié en mesurant le rapport d'un élément comme le HPO_4 de la couche hydratée sur l'élément PO_4 de la couche apatitique, notamment par microspectroscopie Raman. Un os nouvellement formé ou jeune présentera une teneur en HPO_4 supérieure à un os plus ancien [26].

Caractéristiques principales du cristal d'apatite

Le cristal d'apatite est caractérisé par :

1. la présence de substitutions ioniques cationiques au sein de la maille cristalline, au voisinage de sites spécifiques (Ca I et II). Certaines substitutions peuvent être irréversibles, comme dans le cas de la substitution d'un OH^- par un F^- qui aboutit à la formation d'un composé plus stable (fluoroapatite) [40]. L'apatite osseuse peut également contenir des carbonates sous la forme CO_3^{2-} qui peuvent se substituer aux PO_4^{3-} (substitution de type B) ou aux OH^- (substitution de type A). De telles substitutions conduisent à des modifications des axes a et c de la maille élémentaire [54].
2. son degré d'organisation (cristallinité), c'est à dire l'arrangement des ions dans la maille cristalline. Ce paramètre qualitatif peut être apprécié par des techniques classiques de cristallographie (diffraction au RX), mais aussi par des techniques de spectroscopie vibrationnelle (IR, Raman). Même si ce paramètre augmente au cours de la maturation physiologique du minéral osseux, maturation et cristallinité sont à distinguer. Dans un cristal jeune, le domaine apatitique, réduit et mal organisé, conduit à une cristallinité faible qui va augmenter conjointement avec la maturation du minéral. Cependant, la cristallinité peut être modifiée par la présence d'ions étrangers comme les carbonates, qui conduisent à sa diminution ou comme le fluor qui l'augmente [74]. Une cristallinité élevée n'est pas automatiquement associée à une amélioration de la qualité de l'os. En effet, il a été montré qu'une cristallinité

élevée pouvait être associée à un os "cassant", plus fragile et favorable à l'initiation de microcracks [14].

c) Relations entre la matrice collagénique et la minéralisation

La minéralisation du tissu osseux constitue le dépôt d'une substance minérale au sein d'une matrice organique extracellulaire. Chez l'être humain, il s'agit généralement d'une calcification, c'est à dire du dépôt de phosphate de calcium dans la matrice organique osseuse (tissu ostéoïde). Au cours de l'ostéogenèse, cette calcification conduit à la formation d'os à partir d'une matrice protéique aux formes et dimensions spécifiques.

Nucléation cristalline

Dans le cas du minéral osseux, la nucléation est hétérogène. Ce processus d'envahissement des interstices de la trame collagénique débute au niveau des zones sombres des fibres de collagène - partie moins riche en AA liée au décalage des fibrilles de tropocollagène les unes par rapport aux autres - (Figure 6). Les cristaux vont envahir ces zones vacantes puis les espaces longitudinaux inter-fibrillaires et finalement recouvrir l'intégralité des fibres de collagène. Dès que le mécanisme de nucléation est initié, les cristaux vont croître jusqu'à ce qu'ils atteignent leur taille et leur forme définitives.

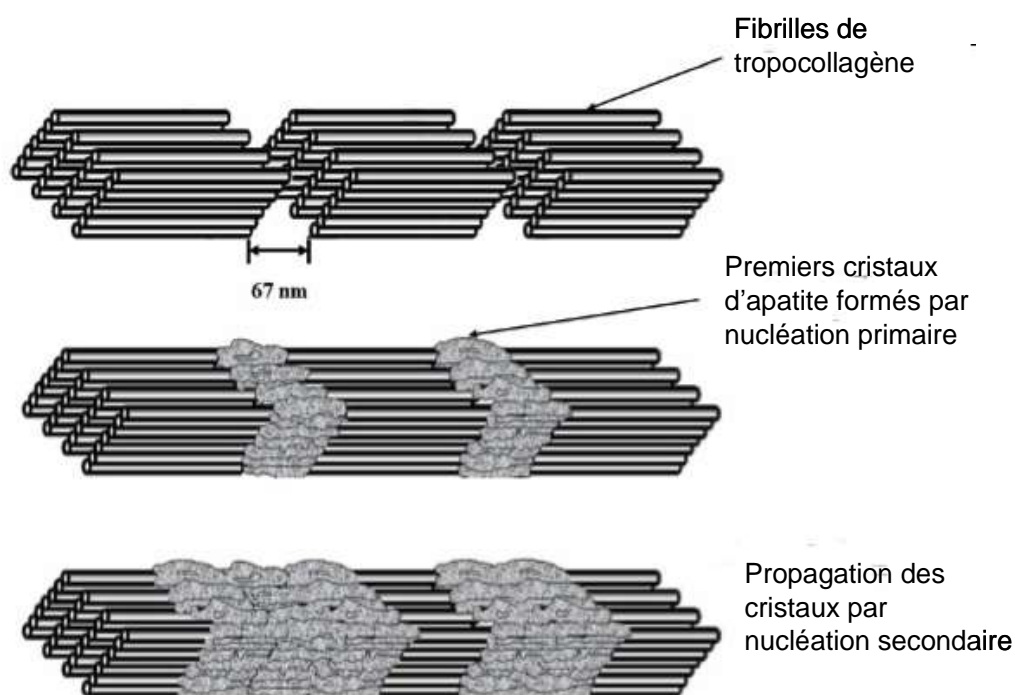


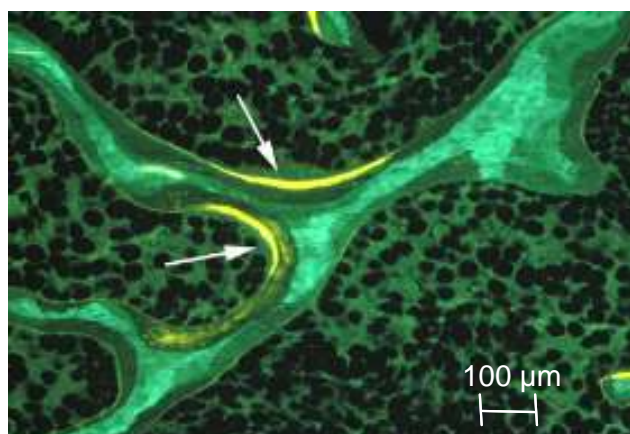
Figure 6 : Schéma représentant la nucléation et la propagation du minéral osseux à partir des zones sombres du collagène, adapté de Landis, 1979[39]

Front de minéralisation

La formation osseuse se réalise en 2 temps :

1. Tout d'abord, l'espace résorbé est comblé par une matrice organique néosynthétisée.
2. Ensuite, cette matrice (tissu ostéoïde) se minéralise rapidement par nucléation secondaire où les nouveaux cristaux se forment au contact de ceux de la matrice calcifiée sous-jacente (front de minéralisation) : c'est la minéralisation primaire

Le front de minéralisation peut être identifié par des marqueurs vitaux qui se fixent spécifiquement au minéral en cours de formation, et qui émettent une fluorescence sous illumination (tétracyclines : calcéïne...). Le traitement séquentiel avec un marqueur vital est à la base de l'histomorphométrie dynamique et permet de calculer le taux de remodelage osseux, mais aussi la vitesse de minéralisation (Figure 7) [18].



**Figure 7 : Coupe histologique de tissu osseux observée en microscopie à balayage laser permettant la visualisation d'un marquage par les cyclines (flèches blanches), d'après Chappard.D [17]
Chaque marque fluorescente révèle le front de minéralisation actif au moment où la dose a été administrée**

Suite à la minéralisation primaire, la phase de minéralisation secondaire débute. Il s'agit d'une étape lente et progressive d'augmentation du nombre, de la taille et de la perfection de cristaux. La durée précise de la minéralisation secondaire n'est pas connue chez l'être humain mais il est estimé qu'elle dure de quelques mois à plusieurs années. Cependant, elle a été étudiée sur des modèles animaux avec l'utilisation d'un protocole d'injections périodiques de différents marqueurs vitaux sur plusieurs mois permettant de "dater" l'âge des unités structurales élémentaires et d'en déduire la chronologie de minéralisation. Elle serait achevée après ~3 mois chez le rat [15]. L'activité du remodelage osseux est un déterminant majeur de la charge minérale maximale que peut

atteindre le tissu osseux. Un taux de remodelage élevé augmente la probabilité qu'une unité structurale élémentaire soit résorbée avant qu'elle ait complété sa minéralisation.

2. Physiologie du remodelage osseux

Ce mécanisme dynamique consiste à remplacer un tissu osseux ancien ou endommagé par une matrice nouvellement synthétisée et donc de pérenniser la masse et la compétence mécanique de l'os grâce à l'action combinée des cellules osseuses qui jouent un rôle essentiel dans le renouvellement osseux. C'est un acteur majeur de l'homéostasie phosphocalcique permettant à la fois le stockage des divers éléments (formation et minéralisation) mais aussi leur distribution dans le système circulatoire (résorption osseuse). Les étapes de résorption et formation étant liées, une action sur l'une aura une conséquence sur l'autre.

A. Différentes étapes du remodelage osseux et facteurs régulant

Toutes les cellules du tissu osseux, précédemment décrites, vont avoir un rôle coopératif au sein d'une unité dynamique appelée "unité multicellulaire de base" ou encore "unité fonctionnelle de remodelage osseux". Dans les conditions physiologiques, la quantité de matrice formée comble la quantité résorbée. Le résultat d'un cycle de remodelage correspond à la formation d'une nouvelle "unité structurale élémentaire" (ostéon cortical ou paquet osseux trabéculaire). La chronologie d'un cycle de remodelage osseux est une séquence immuable qui contient 4 étapes (Figure 8):

1. **La résorption**, dans les lacunes de Howship, par les OC après adhésion à la surface ;
2. **L'inversion** faisant intervenir la transmission de signaux entre chacune des cellules de l'os. La surface est "préparée" par la synthèse d'une fine couche ($< 5\mu\text{m}$) de matrice propice à l'adhésion cellulaire des cellules ostéoformatrices. Cette couche, appelée "ligne cémentante d'inversion", est riche en OPN et pauvre en collagène de type I et assure l'interface entre l'unité de remodelage et le tissu environnant [69] ;
3. **La formation** par les OB s'effectue en 2 étapes :
 - a. Synthèse d'une nouvelle matrice ostéoïde,
 - b. Minéralisation de celle-ci ;
4. La phase de **quiescence** (jusqu'au prochain cycle de remodelage).

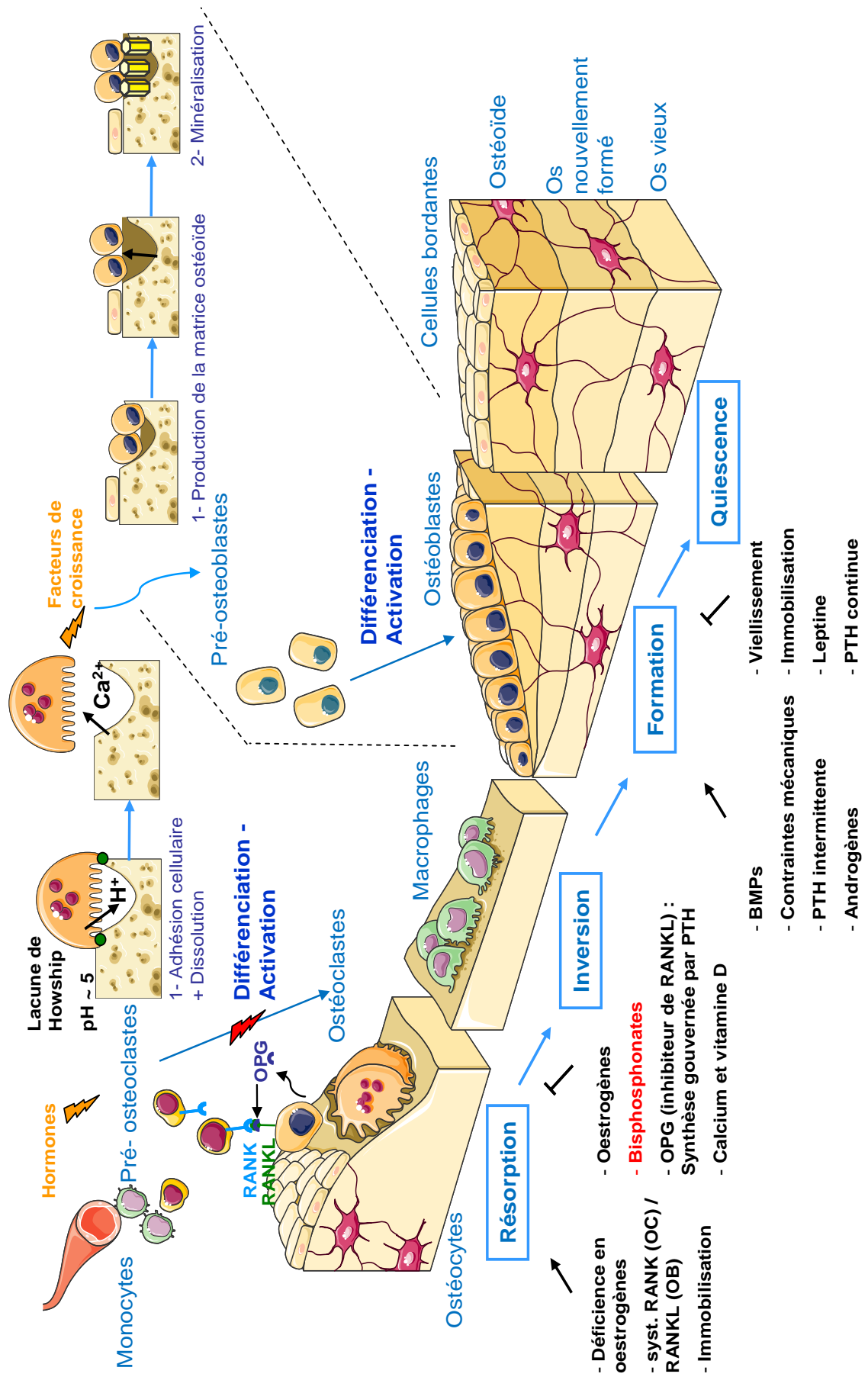


Figure 8 : Schéma des différentes étapes du remodelage osseux et des principaux facteurs régulant la balance résorption / formation, adapté de Pascaud [51] et Bala [6]

B. Maturité minérale osseuse corticale et trabéculaire

La maturité minérale osseuse dans les compartiments minéral et organique, corrélée à l'âge tissulaire, est influencée par le remodelage du tissu osseux. Pour un même volume de tissu osseux, le nombre d'unités de remodelage actives est 20 fois supérieur dans l'os trabéculaire que dans l'os cortical, bien que ce dernier représente 80% de la masse osseuse totale de l'adulte. Il en résulte un renouvellement global d'environ 25%/an de l'os trabéculaire et de 4%/an de l'os cortical. Cette différence de fréquence d'activation explique le fait que les répercussions des pathologies osseuses impliquant un dérèglement du remodelage osseux soient plus importantes dans le compartiment trabéculaire que dans le compartiment cortical [30].

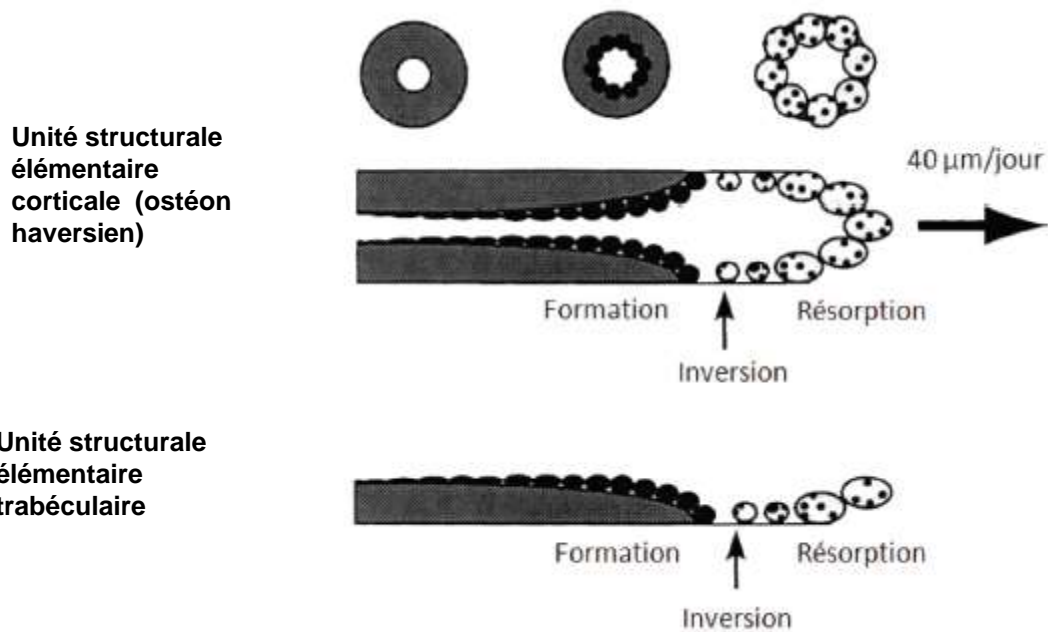
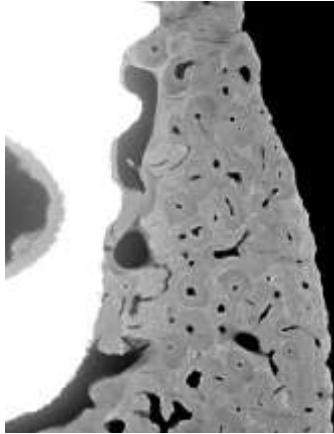


Figure 9 : Schéma représentant le remodelage au sein d'une unité structurale élémentaire corticale et trabéculaire, adapté de Parfitt [50]

Le remodelage osseux étant asynchrone dans l'espace et le temps, il en résulte, au niveau tissulaire, une hétérogénéité de la minéralisation et de l'âge tissulaire aussi bien dans le compartiment cortical que trabéculaire. L'activité du remodelage osseux est donc un facteur majeur du niveau de minéralisation que peut atteindre une unité de remodelage (Figure 9). Une fréquence élevée d'activation du remodelage aura pour conséquence d'augmenter la probabilité qu'une unité structurale élémentaire (ostéons) soit résorbée avant qu'elle n'atteigne un degré de minéralisation maximale, et inversement. Dans le cas d'un remodelage rapide, le degré de minéralisation moyen du tissu aura tendance à rester faible, et inversement.

A.



B.

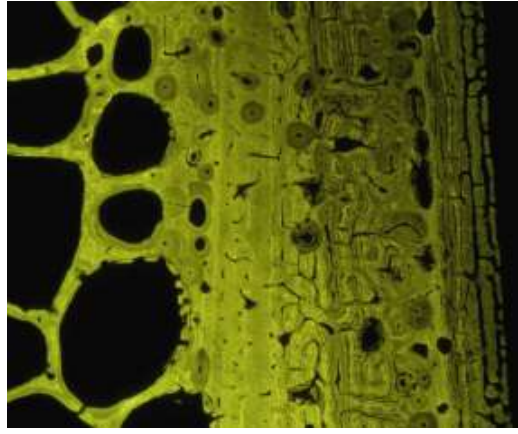


Figure 10: A. Microradiographies de coupes de tissu osseux mandibulaire de chien après implantation, d'après Brasseur
B. Microradiographie de coupe de tissu osseux bovin atteint de fluorose montrant l'hétérogénéité de la minéralisation au niveau cortical et trabéculaire, d'après Schuppe
Les faibles niveaux de gris reflètent un faible degré de minéralisation et inversement.

3. Quid de la qualité osseuse et ses déterminants ?

A. Approche multi-échelle du tissu osseux : les différents niveaux d'organisation structurale du tissu osseux

L'os est un tissu composite complexe et hautement hiérarchisé (Figure 11) dans lequel chaque niveau d'organisation influence le niveau d'organisation structurale supérieur (depuis les constituants élémentaires de base du tissu osseux, les cristaux de minéral osseux et l'armature de fibres de collagène, jusqu'à l'organe "os" intégré dans le système locomoteur). Cette organisation est orchestrée par une activité de remodelage permanente au sein du tissu osseux. Il s'agit d'un tissu dynamique qui s'adapte, se remodèle et s'organise en fonction des contraintes qui lui sont imposées en modifiant, outre son organisation micro-architecturale, sa composition chimique [21]. M.D Morris montrait, en 2010, que la composition chimique de l'os était un contributeur important de la qualité osseuse [46].

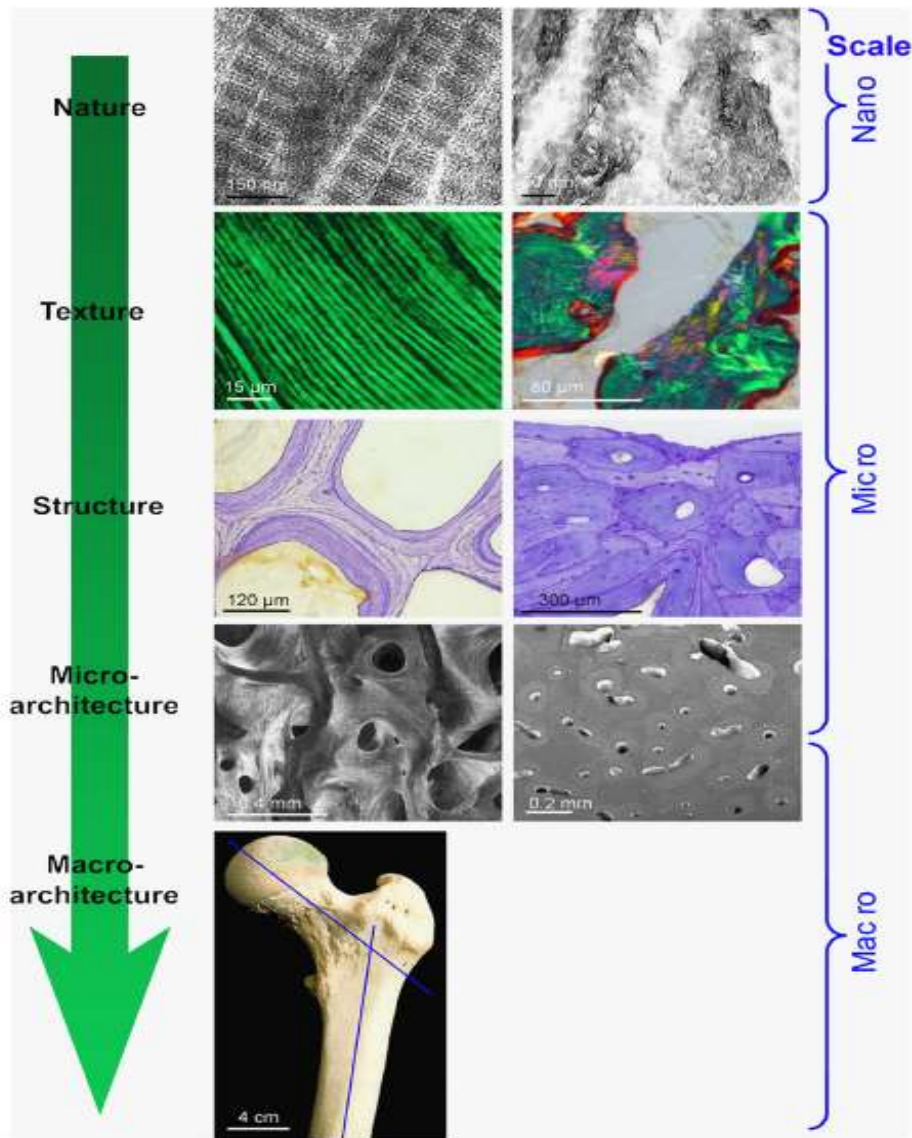


Figure 11: Les 5 niveaux d'organisation du tissu osseux et leurs échelles, d'après Chappard.D [17]

1. Nature (ou composition) - échelle nanoscopique : Phase organique (trame collagénique) et phase minérale (cristaux d'hydroxyapatite)
2. Texture - échelle microscopique : compact ou spongieux, la texture du tissu osseux de l'adulte est de type lamellaire (matrice disposée en lamelle) dans l'os mature – elle est fibreuse dans l'os immature ("woven bone")
3. Structure - échelle microscopique : concentriques dans l'os cortical (système haversien) - travées dans l'os trabéculaire
4. Micro-architecture - échelle mésoscopique : os compact dans l'os cortical - interconnexions dans l'os trabéculaire
5. Macro-architecture - échelle macroscopique : morphologie de l'enveloppe extérieure osseuse (courbures des os, angles...)

B. Concept de qualité osseuse

Les lois de Wolff ont permis, à la fin du XIX^{ème} siècle, d'établir la corrélation entre la structure d'un matériau et sa fonction. Comme tout matériau, la capacité d'un os à absorber les contraintes qui lui sont appliquées sans se rompre est dépendant de ses propriétés matérielles qui sont quantitatives (la masse et la densité minérale osseuse) et qualitatives (taille et géométrie osseuse, microarchitecture, paramètres de composition et de structure).

Le concept actuel de qualité osseuse est associé à une notion multi-échelle qui regroupe l'ensemble des caractéristiques liées notamment à la macro/microarchitecture et à la composition moléculaire du tissu osseux. Ces caractéristiques sont orchestrées par la dynamique de remodelage et confèrent au tissu osseux des propriétés histologiques et mécaniques propres lui permettant d'assurer ses différentes fonctions [10,45].

C. Déterminants de la qualité osseuse et moyens d'évaluation

Comme nous l'avons vu, la qualité osseuse étant une notion multi-échelle, les moyens d'évaluation de ses déterminants varient selon l'échelle d'observation du tissu osseux. Aucune méthode ne permet, à elle seule, de caractériser complètement la qualité osseuse (Figure 14) [22]. Les déterminants de la qualité osseuse (géométrie osseuse, microarchitecture, composition et structure minérales et protéiques), jouent un rôle important pour le maintien des propriétés mécaniques de l'os, tout comme les paramètres quantitatifs (masse et densité minérale osseuses) [44].

a) Echelle macroscopique

Géométrie osseuse (taille, épaisseur...)

Les facteurs relatifs à la taille (masse totale de l'os) et à la géométrie (distribution de la masse dans l'espace) entrent en jeu dans la résistance mécanique osseuse. Il a été montré que la perte osseuse liée à la ménopause était aussi accompagnée d'une apposition périostée induisant une augmentation du diamètre des os (Figure 12). Cette apposition périostée, plus importante chez les hommes, permet de compenser la résorption endostéale qui augmente avec l'âge. Elle pourrait expliquer en partie la différence de

risque de fracture liée à l'âge observée entre les hommes et les femmes [44,60]. La géométrie osseuse étant corrélée à la résistance mécanique osseuse, elle est évaluée principalement par des tests mécaniques et peut être modélisée par des techniques d'ingénierie : méthode des éléments finis [55].

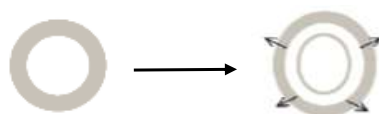


Figure 12: Schéma de l'apposition périostée et de la résorption endostéale physiologiques dans le cas de l'ostéoporose., adapté de Boskey [9]

b) Echelle microscopique

Microarchitecture osseuse

L'organisation tridimensionnelle des masses de tissu osseux dans l'espace joue aussi un rôle dans la résistance aux sollicitations mécaniques au niveau cortical comme trabéculaire. Chez la souris, la variation du taux de remodelage liée à l'âge ou à la prise d'un traitement tel que les BPs modifie cette organisation [11]. La microarchitecture osseuse est analysée par des techniques tomographiques quantitatives à RX (QCT, HR-pQCT, μ CT). Les déterminants de cette microarchitecture sont au niveau cortical principalement l'épaisseur et la porosité, et au niveau trabéculaire le nombre, l'orientation et les connexions des travées [18]. La perte de connectivité trabéculaire (rupture de travée) diminue la résistance mécanique comparée à un simple amincissement de travées (Figure 13). L'os trabéculaire est d'autant plus résistant lorsque son orientation principale suit l'axe des contraintes mécaniques et que sa connectivité est élevée [62].

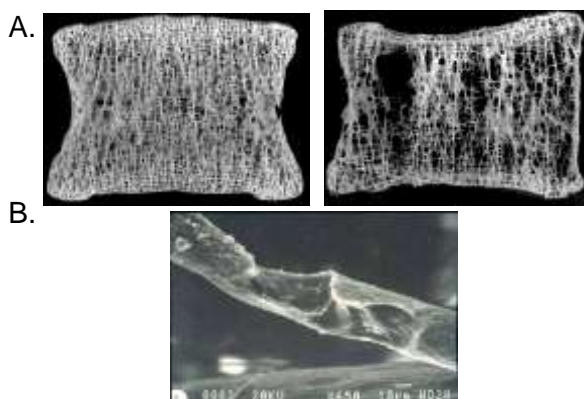


Figure 13 : Micro-architecture osseuse

A. Photographies de coupes frontales de corps vertébraux lombaires illustrant la détérioration de la micro-architecture trabéculaire avec l'âge, d'après Orcel

B. Image en MEB centrée sur une travée osseuse en voie de rupture, d'après Mosekilde

c) Echelle moléculaire

Composition et structure osseuses

i. Phase collagénique

Contenu en hydroxyproline

Il a été montré que les modifications post-traductionnelles du collagène, en particulier l'hydroxylation de la proline, variaient entre les espèces et seraient susceptibles de provoquer des changements de la stabilité de l'organisation hélicoïdale du collagène. Cette configuration spécifique des fibrilles de tropocollagène pourrait représenter des sites favorisant la nucléation et la croissance des cristaux d'apatite [12].

Liaisons croisées du collagène

Au cours de la maturation du collagène, un ensemble de modifications post-traductionnelles (hydroxylation, glycosylation...), enzymatiques ou non, vont aboutir à la formation de molécules de pontage inter et intrafibrillaires appelées « liaisons croisées du collagène » ou « cross-links » [72]. Ces liaisons croisées forment un système complexe qui est important pour la stabilité des fibrilles de collagène.

ii. Phase minérale

Taux de minéralisation

Que ce soit à l'échelle de l'organe, du tissu ou de l'unité structurale élémentaire, il existe de nombreux travaux montrant la corrélation positive entre la quantité et la qualité du minéral osseux et la résistance mécanique. La minéralisation au niveau tissulaire (ou degré de minéralisation) peut être mesurée par différentes techniques (DXA, μ CT, US...). Elle fournit une information sur la distribution de la minéralisation à l'échelle microscopique. Le remodelage osseux étant asynchrone dans le temps et l'espace, il en résulte une hétérogénéité de la minéralisation entre des « unités structurales élémentaires » d'âges différents [5].

Cristallinité

Au cours de la minéralisation osseuse, le nombre de cristaux ainsi que leur taille et leur degré de cristallinité augmentent. Le degré de cristallinité correspond à la perfection de l'arrangement des éléments constituant la maille cristalline.

La cristallinité peut être modifiée par la présence d'ions étrangers inclus dans la maille cristalline par les mécanismes de substitution. En fonction des éléments substitués, la cristallinité peut être diminuée (cas des substitutions carbonatées) ou augmentée (cas des substitutions fluorées) [8].

Carbonatation

L'apatite osseuse est non stœchiométrique; c'est-à-dire que des substitutions ioniques existent entre les éléments de sa structure et de son environnement participant à son processus de maturation. On distingue des substitutions carbonatée de type A (incorporation d'un CO_3^{2-} à la place d'un PO_4^{3-}) et de type B (incorporation d'un CO_3^{2-} à la place d'un OH^-) [54].

Contenu en HPO_4

Dans l'os jeune, les apatites osseuses sont caractérisées par la présence d'une couche hydratée à la surface des cristaux offrant la possibilité d'échanges ioniques à l'interface. Ces échanges ioniques contribuent à la croissance et à la maturation des cristaux d'apatites. La proportion des éléments de la couche hydratée (HPO_4) peut être un indicateur de l'état de maturation des cristaux d'apatite.

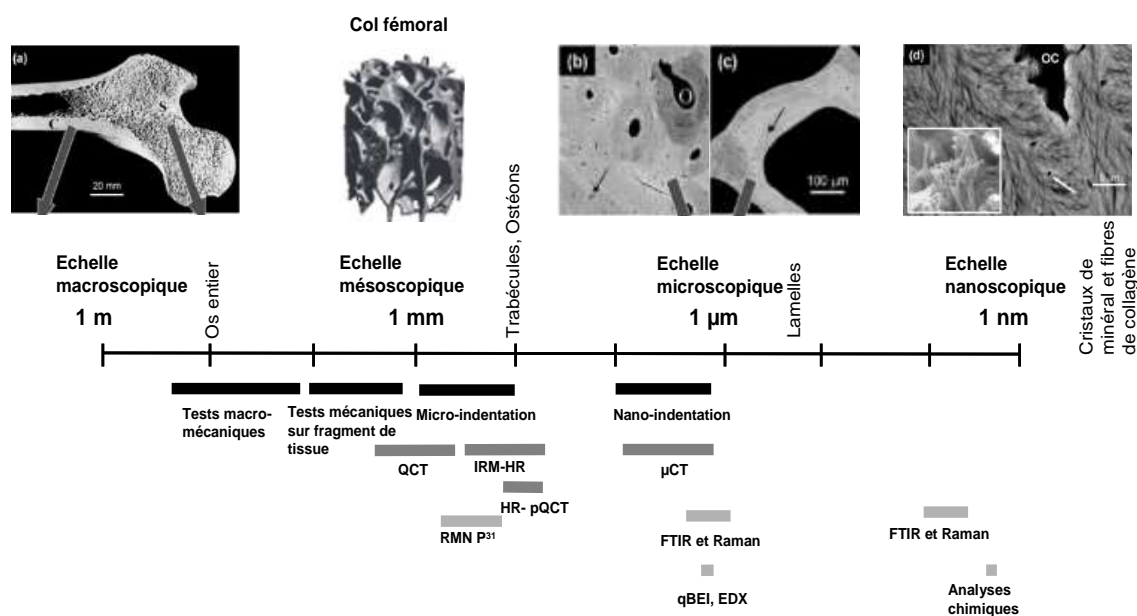


Figure 14 : Schéma de synthèse des techniques d'évaluation des déterminants de la qualité osseuse à chaque échelle d'organisation du tissu osseux, adapté de Fratzl [28] et Donnelly [22]

Chapitre 2 - Les bisphosphonates (BPs)

1. Généralités - Classification chimique des principaux BPs

Les BPs sont des composés initialement utilisés dans l'industrie pour leurs propriétés anticorrosives et anticalcaires. Dans les années 1960, Neuman et Fleisch ont montré que le plasma et l'urine contenaient un composé, le pyrophosphate inorganique (PPi) (contenant un pont P-O-P), capable d'inhiber la précipitation du phosphate de calcium en se fixant à des cristaux d'apatite nouvellement formés et de prévenir *in vivo* les calcifications ectopiques (notamment rénales, endo-vasculaires...). Ces résultats ont conduit à l'hypothèse que le PPi pourrait être un régulateur physiologique majeur de la minéralisation osseuse. Cependant, l'échec de l'utilisation du PPi administré par voie orale, lié à son hydrolyse rapide, a restreint son utilisation comme agent de contraste en scintigraphie (lié au ^{99m}Tc , Figure 15) et anti-tartre dans les dentifrices [27,63]. La recherche s'est ensuite axée autour du développement d'analogues du PPi qui seraient stables à l'hydrolyse enzymatique, ce qui a abouti à l'étude des propriétés pharmacologiques et biologiques des BPs [20,65].

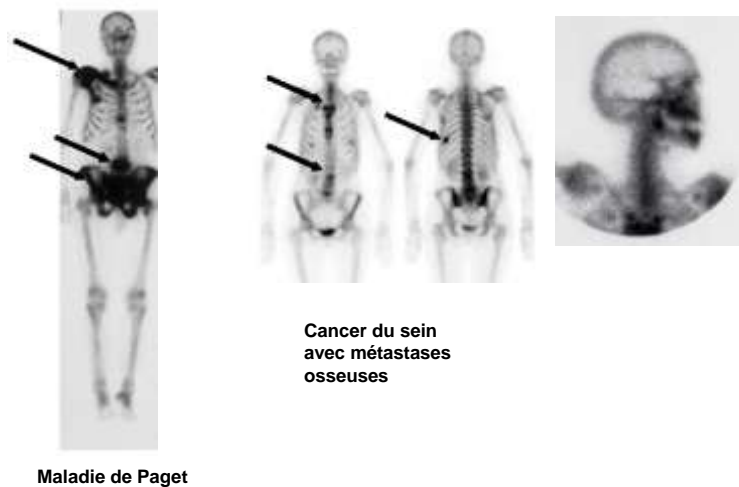


Figure 15 : Leçons tirées de l'utilisation de ^{99m}Tc -BP comme agent de contraste en scintigraphie osseuse, adapté de Russell [67] et Marx [41]

Les flèches noires montrent l'accumulation sélective de BP dans les sites à fort taux de remodelage :

A gauche : chez un patient atteint de maladie de Paget

Au centre : chez une patiente atteinte d'un cancer du sein avec métastases osseuses

A droite : au niveau des maxillaires

Les propriétés des BPs en font aujourd'hui le traitement de première ligne de nombreuses pathologies osseuses aussi bien bénignes avec troubles de la minéralisation (ostéoporose, maladie de Paget, ostéogénèse imparfaite) que malignes (myélome multiple, métastases solides...).

La structure chimique élémentaire des BPs, en particulier le pont P-C-P, est très résistante sur le plan chimique (notamment aux enzymes biologiques).

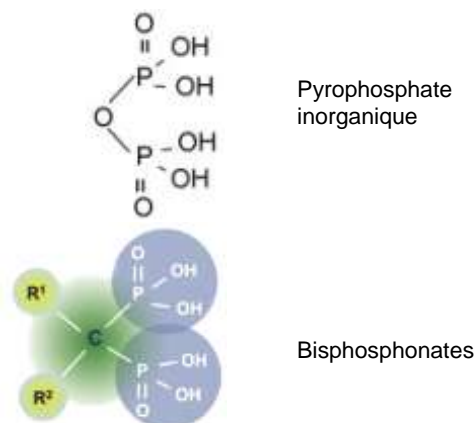


Figure 16 : Représentation comparée des structures chimiques (formules développées) du PPI (en haut) et des BPs (en bas) avec leurs chaînes latérales R1 et R2 de composition variable selon la molécule, adaptée de Russell [64]

Les atomes d'oxygène des groupements phosphates des BPs (Figure 16 en bleu) peuvent être déprotonés à pH physiologique, entraînant la formation de liaison avec un ion métallique divalent (Ca^{2+} , Mg^{2+} ...). Ce mécanisme de chélation est à l'origine de la propriété des BPs de se fixer à l'apatite osseuse et donc de s'accumuler dans le tissu osseux. La liaison du pont P-C-P au calcium (Ca I) du tissu osseux forme une structure qui a pris la dénomination de "bone hook" - en forme de crochet - (Figure 18).

Outre leur capacité à se fixer spécifiquement au minéral osseux, les BPs sont utilisés dans le traitement des pathologies osseuses impliquant des dérégulations du remodelage car ils inhibent la résorption osseuse.

En fonction de la présence ou non d'un atome d'azote dans la chaîne latérale R₂, 2 catégories de BPs existent, les amino-BPs et les non amino-BPs (Figure 17).

Lorsque R₁ est un groupement OH, la fixation du BP à l'os est augmentée. La composition du site R₂ détermine le potentiel anti-résorptif et module l'effet du BP sur l'apatite.

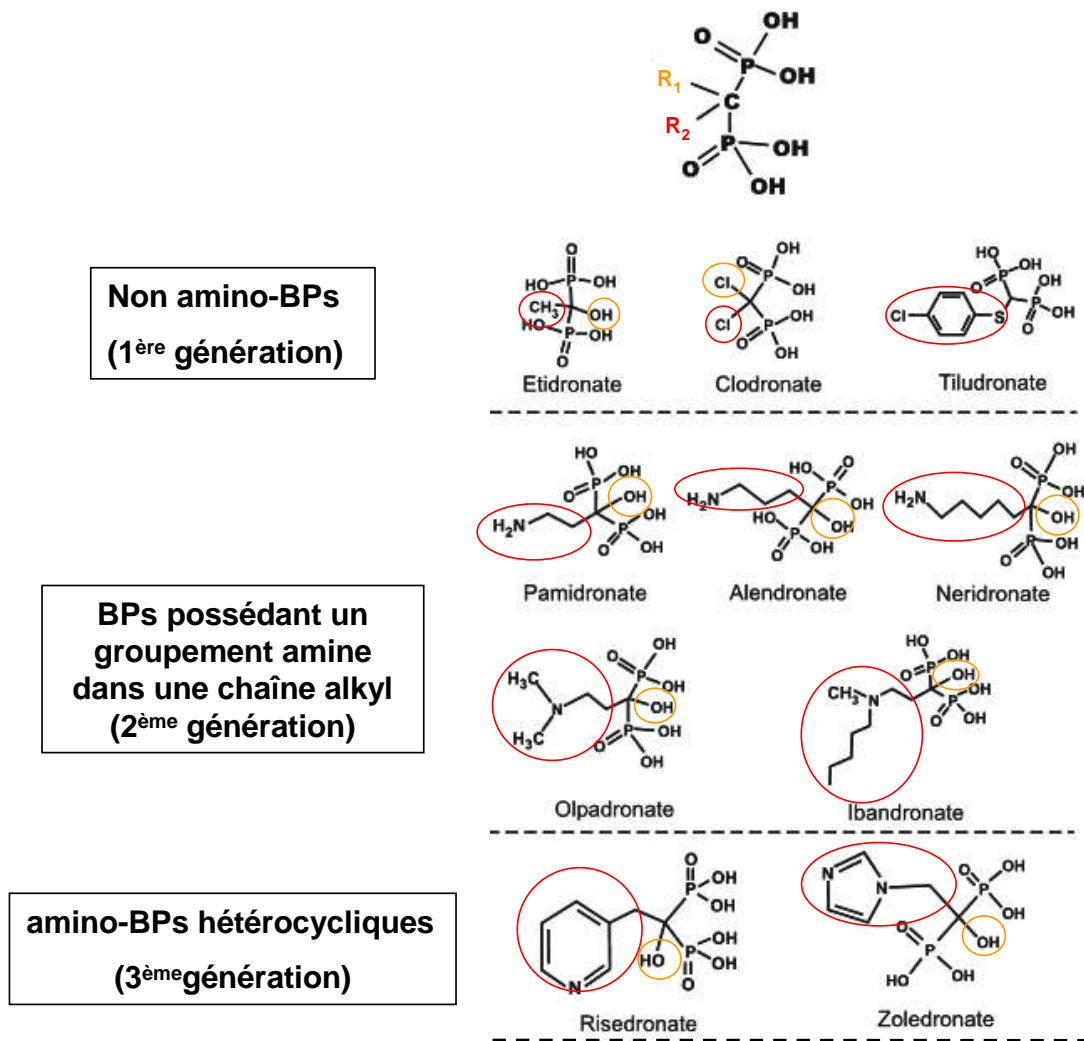


Figure 17 : Classification des principales familles de BPs, adapté de Russell [67]

2. Principales propriétés connues des BPs

Les BPs ont une forte affinité pour le calcium de l'apatite osseuse. Des études portant sur la cinétique d'inhibition de la formation de cristaux d'apatite synthétique ont montré des différences de constante d'affinité en fonction du BP considéré. Les auteurs ont classé les BPs les plus courants en fonction de leur affinité pour les apatites de synthèse biomimétiques : zolédronate > alendronate > ibandonate > risédronate > étidronate > clodronate [33,48]. L'ensemble des données implique que la structure du BP détermine son degré d'affinité pour le minéral osseux.

En fonction du degré d'affinité du BP pour le minéral osseux, 30 à 70% des BPs administrés se fixent à l'os avec une distribution non uniforme au sein du squelette. La localisation préférentielle des BPs aux sites de fort remodelage semble être liée à une plus grande exposition des cristaux d'apatite aux zones préparées pour la résorption

osseuse. Chez l'Homme, la mesure des BPs excrétés dans les urines à distance de la prise du traitement a permis indirectement de mesurer la rétention osseuse des BPs. Ces mesures, réalisées 24h après la prise de BPs, montrent un taux urinaire qui suit un ordre inverse de celui de l'affinité du BP pour l'apatite : zolédronate (38%) < alendronate (44%) < risédronate (65%) < clodronate (73%). Le temps de rétention variable des BPs dans le squelette laisse à penser que la force de la liaison du BP au minéral peut avoir un effet sur son efficacité clinique. En effet, l'affinité d'un BP pour l'apatite osseuse pourrait moduler son assimilation et sa rétention dans le squelette, sa diffusion dans le tissu osseux, son recyclage (capacité à la réadsorption suite à la désorption) et par conséquent sa rémanence d'action [67].

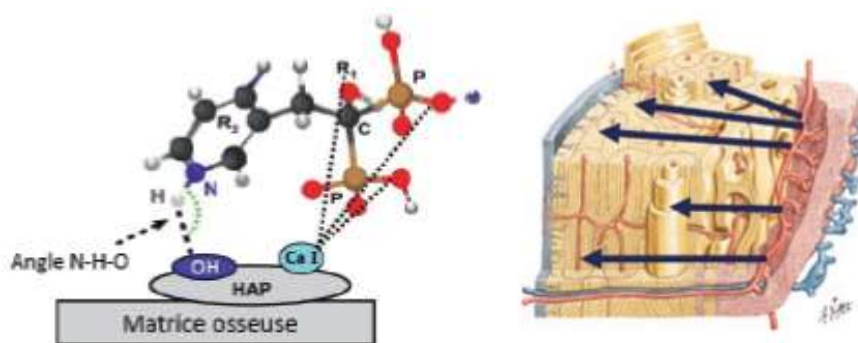


Figure 18: Modèle de l'interaction moléculaire du zolédronate avec l'apatite osseuse (à gauche). Schéma représentatif de la dispersion des BPs dans le tissu osseux depuis la chaîne nourricière vasculaire médullaire (à droite), d'après Russell [66]

Pour certains BPs, on observerait une liaison covalente avec l'apatite qui permet une séquestration au sein de la maille cristalline. Il a été montré également qu'un groupe PO_4^{3-} d'un BP pouvait se substituer à un groupe PO_4^{3-} de la maille cristalline de l'apatite osseuse [34].

Les propriétés biologiques des BPs ont été étudiées par des approches visant à utiliser des BPs porteurs d'atomes radioactifs (C^{14} ou H^3), ou plus récemment par le greffage de sondes fluorescentes aux BPs [70].

3. Mécanismes d'actions des BPs

Les BPs ont une forte affinité pour le minéral osseux et leur présence dans la circulation est très courte. De ce fait, leurs effets dans l'organisme sont majoritairement observés dans le tissu osseux, où ils sont capables d'inhiber la minéralisation et la résorption osseuse [61].

A. Aspects tissulaires

In vitro, les BPs inhibent la formation, la croissance mais aussi la dissolution des cristaux d'hydroxyapatite. *In vivo*, ils inhibent, à forte dose, les calcifications ectopiques, probablement par la captation d'ions Ca^{2+} .

In vitro et *in vivo*, les BPs sont de puissants inhibiteurs de la résorption osseuse. Cette propriété caractéristique des BPs a été initialement attribuée à leur affinité pour le minéral osseux et leur capacité à inhiber la dissolution des cristaux.

Cependant, la constatation de l'effet antirésorptif supérieur d'un BP ayant une affinité moindre par rapport à un autre BP montre l'importance également de l'action cellulaire.

B. Aspects cellulaires

Les BPs se fixent essentiellement à la phase minérale des surfaces osseuses en cours de résorption et donc à proximité des OC. L'acidification des lacunes de résorption permettrait aux BPs de se libérer de la matrice osseuse (désorption) et d'être internalisés par les OC actifs, sous forme de microprécipités au sein de vésicules d'endocytose. Plus récemment, l'utilisation de dentine incubée avec de l'alendronate marqué par un fluorochrome a permis de visualiser l'internalisation de l'alendronate par des OC matures de lapin (Figure 19) [19].

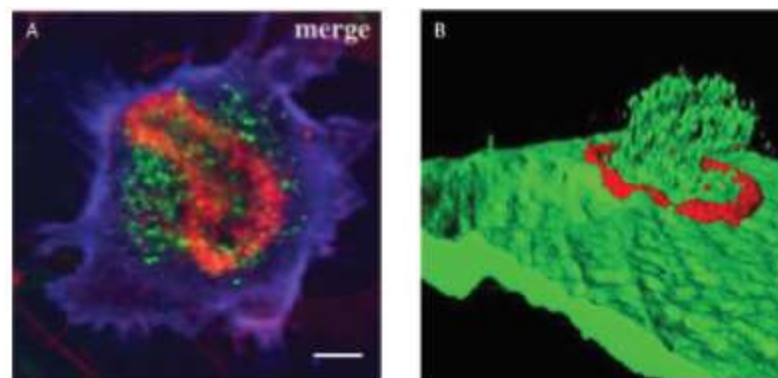


Figure 19 : Représentation de l'internalisation intra-cellulaire d'alendronate marqué par la CFSE, carboxy fluorescein succinimidyl ester (marquage vert) d'après Coxon [19]

Une fois internalisés par les OC, les BPs entraînent une cascade d'effets diminuant l'activité de résorption, notamment par la perturbation de la réorganisation du réseau cytosquelettique d'actine (marquage rouge, Figure 20 A. et B.), indispensable à l'adhésion des OC à la surface osseuse. Finalement, les BPs inhibent, par divers moyens, l'activité ostéoclastique.

La découverte de la diminution des marqueurs biologiques de formation osseuse au cours d'un traitement aux BPs a suscité un intérêt croissant sur une possible action des BPs sur les cellules ostéoformatrices. In vitro, les BPs semblent également interagir avec les OB notamment sur leur différenciation et leur prolifération [58]. In vivo, il reste difficile de mettre en évidence un effet direct potentiel sur les OB.

De plus, les BPs peuvent également interagir avec les ostéocytes *via* le fluide extracellulaire, contenu à l'intérieur des logements canaliculaires et des ostéoplastes. (Figure 19). Il semblerait que les BPs auraient alors une activité anti-apoptotique sur les ostéocytes.

5. Effets des BPs sur la qualité osseuse

a) Effets sur le remodelage osseux, la microarchitecture et l'accumulation de microcracks

Le rôle essentiel des BPs est la réduction de l'activité du remodelage osseux par son activité anti-ostéoclastique. Cette action ralentit, dans le contexte de l'ostéoporose ménopausique, la perte osseuse générée par un remodelage excessif. A court terme, le ralentissement du remodelage permet le comblement quantitatif de la perte osseuse antérieure au traitement et, par conséquent, une augmentation de la densité minérale osseuse est observée. A long terme, l'inhibition de la résorption conduit au maintien de ce gain de densité.

Dans des modèles animaux, des doses thérapeutiques de BP diminuent l'activité du remodelage osseux dans la mandibule à court terme (6 mois de traitement) d'environ 15% et à plus long terme (3 ans de traitement) de 67% [1]. De plus, de fortes doses de zolédronate à doses thérapeutiques équivalentes anti-tumorales inhibent 95% du taux de remodelage cortical au niveau mandibulaire à long terme (3 mois de traitement) [3].

Les études des effets du zolédronate sur les paramètres micro-architecturaux ont principalement été réalisées à long terme (> 1 an). Il résulte de ces études que

l'épaisseur corticale d'une part, et le volume trabéculaire, le nombre, l'épaisseur et la connectivité des travées d'autre part, sont augmentés après traitement [57].

Il semblerait que l'utilisation de BPs à des doses élevées ou comparables à celles utilisées en clinique favorise, de manière précoce, l'accumulation de microcracks dans les modèles animaux. Les études chez l'être humain ont été réalisées sur des biopsies d'os iliaque, site non porteur et ne reflétant que partiellement la densité de microcracks des autres sites osseux, mais il semblerait qu'il y ait la même tendance.

b) Effets sur la minéralisation

Théoriquement, une réduction de la fréquence d'activation du remodelage augmente la durée de vie d'une unité structurale élémentaire, qui dispose alors d'une période de minéralisation secondaire plus longue avant d'être résorbée par un nouveau cycle de remodelage. Ainsi, une augmentation de la proportion d'unités structurales élémentaires plus matures entraînerait une augmentation du degré de minéralisation et une homogénéisation de la minéralisation tissulaire. La suppression du remodelage osseux par les BPs induit une augmentation et une homogénéisation de la minéralisation aussi bien à l'échelle tissulaire que cristalline (augmentation du nombre de cristaux). Un tissu osseux plus minéralisé et plus homogène pourrait être un terrain favorable à l'initiation et à la progression de microcracks [14]

c) Effets sur la composition et la structure osseuses

Peu d'études existent sur les effets à court terme des BPs sur la composition et la structure osseuses chez l'être humain. Les quelques études existantes ont été conduites chez l'animal ou sur des biopsies de crête iliaque prélevées chez des jeunes femmes dans un contexte pathologique de l'ostéoporose post-ménopausique et après administration d'un traitement sur le long terme. Ces études semblent montrer des variations de maturation du contenu minéral et organique à l'échelle moléculaire, en particulier une minéralisation ainsi qu'une maturation collagénique augmentées, permettant ainsi de compenser les effets délétères de l'ostéoporose post-ménopausique [13,29]. De plus, une étude récente a mis en évidence une « minéralisation excessive » au niveau de la mandibule qui serait liée à l'administration des BPs dans le contexte physiopathologique spécifique de l'ONM [49].

6. Objectifs des travaux de thèse

Les BPs de dernière génération font partie des traitements les plus couramment utilisés pour réduire le risque de fracture chez des patientes diagnostiquées ostéoporotiques selon des critères densitométriques, mais aussi pour réduire les complications osseuses dans le cas de cancers invasifs. Ces traitements étant souvent administrés de manière chronique, il convient donc d'en connaître les effets sur les propriétés de la matrice osseuse à court et plus long terme. Certains cas de complications liés à une utilisation prolongée de BPs ayant été rapportés (ex : fractures fémorales atypiques, ONM), les variations de la qualité osseuse liées à l'utilisation des BPs nécessitent d'être mieux appréhendées. A ce jour, peu de techniques permettent d'accéder à des variables reflétant les paramètres qualitatifs à l'échelle moléculaire tels que la composition et de la structure osseuses. Ce travail se propose d'étudier, par une approche expérimentale, l'impact à court terme de l'acide zolédronique sur la qualité osseuse mandibulaire à l'échelle moléculaire chez le rat.

Partie 2

- APPROCHE EXPERIMENTALE : IMPACT DE L'ACIDE ZOLEDRONIQUE SUR LA QUALITE OSSEUSE MANDIBULAIRE A L'ECHELLE MOLECULAIRE CHEZ LE RAT-

Après une introduction contextuelle, nous aborderons l'effet à court terme de l'acide zolédronique sur la qualité osseuse mandibulaire à l'échelle moléculaire. La composition et la structure osseuses seront évaluées par microspectroscopie Raman au niveau de la mandibule après administration d'acide zolédronique à forte dose chez le rat dans un contexte non pathologique.

Dans un premier temps, nous présenterons le modèle animal et les modalités d'injection, les techniques préparatoires des échantillons osseux mandibulaires et les méthodes d'évaluation de la qualité osseuse, à l'échelle moléculaire, utilisées.

Dans un deuxième temps, nous comparerons les moyennes des paramètres physico-chimiques calculées en Raman entre les groupes traité (ZA) et contrôle (S) en prenant en considération l'âge tissulaire, grâce à un double marquage fluorescent permettant la localisation des plages d'os nouvellement formé, et la zone anatomique (alvéolaire / basale). Une discussion sera proposée à partir de l'ensemble des résultats

1. Contexte de l'étude

Du point de vue moléculaire, la microspectroscopie Raman est un outil de choix pour l'étude des déterminants de la qualité osseuse. Elle permet une caractérisation simultanée des compartiments minéraux et organiques osseux. L'analyse des paramètres physico-chimiques (PPC) en Raman mesure les variations relatives de composition et de structure osseuses. Il existe une corrélation entre les PPC calculés, les propriétés mécaniques et le métabolisme osseux [7,23,75].

Bien que les mécanismes concourant à la liaison des BPs à l'os commencent à être élucidés, l'impact de cette interaction sur la qualité osseuse et ses déterminants (microarchitecture, ultra-structure et composition moléculaire) et surtout la signification biologique des différences induites sont aujourd'hui encore insuffisamment connus (manque de référentiels).

Dans la littérature, à l'échelle moléculaire, les PPC osseux (minéralisation, cristallinité, carbonatation, collagen cross-links...) varient avec l'âge et le type tissulaire (corticale ou spongieux) mais aussi en fonction de la localisation anatomique dans le squelette [32,71].

Cependant, il n'est pas clairement établi si les variations observées sont un effet de site et/ou d'âge et de type tissulaire. D'autre part, la cinétique de ces modifications a été peu étudiée. Les effets à court terme, en particulier, sont mal connus.

Les effets des BPs sur la qualité osseuse ont principalement été étudiés sur des os longs mais les spécificités de site mandibulaire ont été peu explorées. Pourtant, parmi les os composant le squelette, la mandibule apparaît avoir des spécificités de site [38,1,42]. La mandibule possède une origine embryonnaire différente (ecto-mésenchymateuse) par rapport au squelette appendiculaire (origine exclusivement mésodermique). Elle est le support des organes dentaires. C'est également le siège de nombreuses fonctions orofaciales très spécifiques, la mastication en particulier. Enfin, son organisation micro-architecturale et sa composition présentent des particularités liées à la physiologie locale [43].

De récents travaux de Raccor (2013) ont montré que la concentration en zoledronate dans les mandibules était 4 fois supérieure à celle fixée dans les os longs [56]. Au sein des mandibules, Kozloff a montré chez le rat qu'il existait 2 sites préférentiels de fixation des BPs, le condyle mandibulaire et le secteur postérieur du corps mandibulaire (Figure 20), [38].

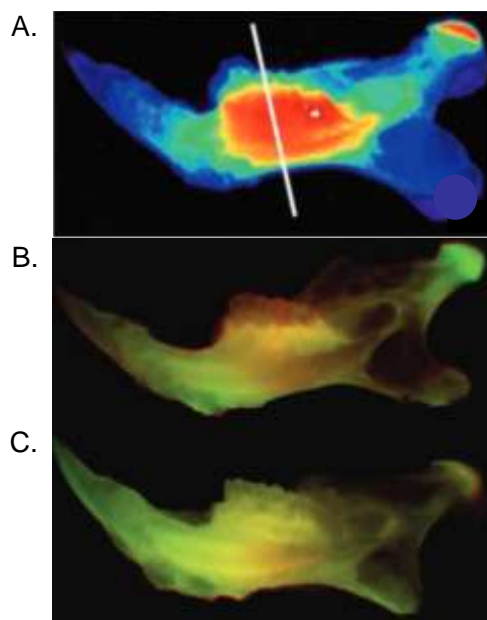


Figure 20 : Images de la répartition du traceur de BPs dans la mandibule (FRFP : Far-red fluorescent pamidronate), d'après Kozloff [38]
Image de la répartition in situ du signal de fluorescence du traceur de BPs in vivo, au niveau de la mandibule de rat (A). Images montrant la rétention du FRFP après 1 semaine (en rouge) et 2 semaines (en vert) in vivo chez un rat traité par BP (B) et chez un rat contrôle non traité (C).

Dans ce contexte, l'objectif principal de cette étude est de déterminer les modifications des paramètres physico-chimiques (PPC), au niveau mandibulaire en secteur denté, suite à l'administration d'acide zolédronique chez le rat.

2. Matériel et méthodes

A. Protocole expérimental : Modèle animal

Les rats sont des mâles de type Sprague-Dawley - fournisseur : Janvier (Paris) - hébergés à l'animalerie du Département Hospitalo-Universitaire de Recherche Expérimentale (DHURE, Lille 2). Le protocole de traitement a été approuvé par le comité d'éthique sous le numéro d'agrément suivant : 59-350137. Les rats sont âgés de 9 semaines au début du protocole expérimental, et en bonne santé (conditions d'élevage conforme aux normes actuelles et conditions d'alimentation : standard, *ad libitum*). 30 rats ont été divisés, aléatoirement, en 2 groupes distincts :

- Le groupe "ZA" (n=15) - Ces rats ont reçu des injections périodiques d'acide zolédronique (NOVARTIS Pharma, Basel - Suisse).
- Le groupe "Serum" (n=15) - Ces rats ont reçu des injections périodiques de sérum (solution salée isotonique).

Le groupe ZA a reçu des injections hebdomadaires de zoledronate à la dose de 100µg/kg/semaine pendant 6 semaines (équivalent à un traitement anti-tumoral d'une durée d'environ 6 mois chez l'humain) avant sacrifice de l'animal. Le groupe S a reçu des injections de sérum physiologique dans les mêmes conditions (Figure 21).

Puis, des injections de dérivés de cyclines ont été réalisées :

- la calcéine (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) avant la 5ème injection de ZA: 30 mg/kg 14j avant sacrifice de l'animal.
- la déméclocycline (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) au même dosage la veille du sacrifice de l'animal.

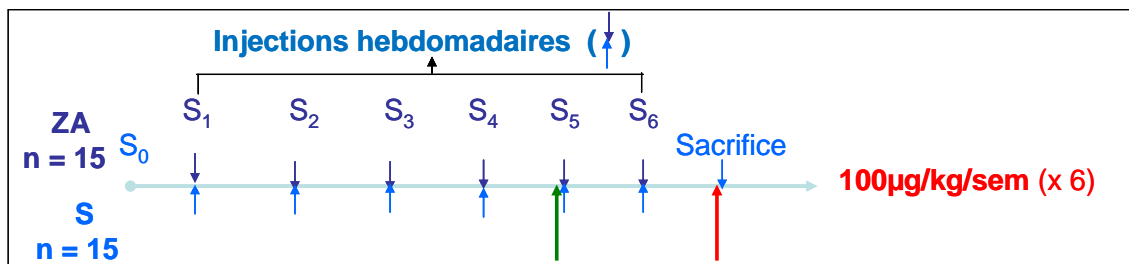


Figure 21 : Schéma du protocole expérimental
Flèche verte : injection de calcéine - Flèche rouge : injection de déméclocycline

Les mandibules des rats sacrifiés ont été prélevées et stockées à -80°C avant préparation et utilisation.

B. Echantillons osseux : inclusion en résine et réalisation des lames minces

Les héli-mandibules droites ont été décongelées puis fixées dans l'éthanol à 70° pendant 2 jours (Figure 22 A). Elles ont ensuite été incluses dans un bloc de résine de type polyméthylmétacrylate (PMMA) puis pré-coupées au niveau du secteur 1^{ère} molaire / 2^{ème} molaire, région de fixation préférentielle des BPs (Figure 224 B.C). Les 30 échantillons ont été envoyés au « Laboratoire de géologie des dépôts sédimentaires » (UMR, CNRS 8110) de l'Université des Sciences et Technologies de Lille 1 où des coupes tissulaires de 100µm d'épaisseur, dans le plan frontal, non décalcifiées et polies ont été faites (Figure 22 D). Ces coupes fines, scellées sur lame de verre, sont celles utilisées pour les analyses ultérieures par microscopie à balayage laser et microspectroscopie Raman.

C. Microscopie confocale à balayage laser

Au sein de la plateforme de bioimagerie cellulaire et moléculaire de Lille 2 (BiCEL), les coupes tissulaires ont été observées avec le microscope confocal à balayage laser AxioObserver (CLSM 710) et l'objectif EC Plan-Néofluar 10x.0,3 NA (Carl Zeiss, Jena, Allemagne). Les acquisitions ont été réalisées en mode séquentiel afin de garantir la spécificité du marquage de chaque fluorophore injecté (dye). Les longueurs d'ondes 488 et 514 nm du laser Argon ont été utilisées respectivement pour imager la calcéine et la déméclocycline. Les images ont été réalisées avec le logiciel d'acquisition Zen 2010 (Carl Zeiss, Jena, Allemagne) en mode mosaïque.

Des modèles *in vivo* sont de plus en plus utilisés pour suivre les séquences de remodelage osseux grâce à des sondes fluorescentes [70]. Ces fluorochromes ont une affinité pour le calcium et se fixent aux fronts de minéralisation. En effet, les images en microscopie à balayage laser représentent les régions de précipitation en calcium au cours de la minéralisation osseuse. L'observation des marqueurs fluorescents en microscopie confocale à balayage laser va donc permettre de distinguer, sur les coupes tissulaires, l'os nouvellement formé (zones marquées) et l'os plus ancien (zones non marquées). Seront ensuite analysées en microspectroscopie Raman, autant dans l'os en remodelage que dans l'os plus ancien, les modifications moléculaires de ces 2 types d'os entre le groupe ZA et le groupe S.

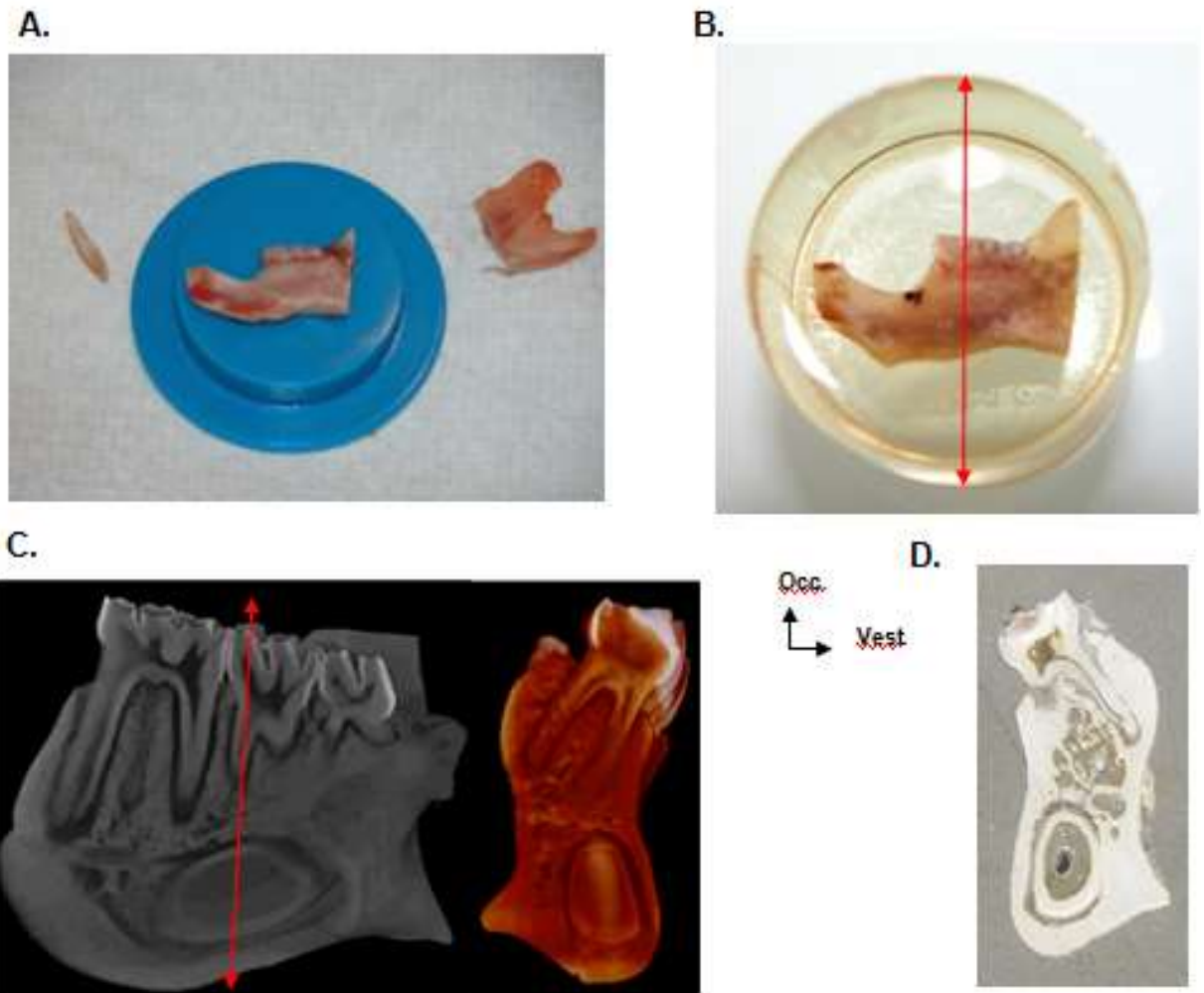


Figure 22 : Etapes de préparation des échantillons osseux avant analyse en microscopie à balayage laser et microspectroscopie Raman.

A. Pièce osseuse sur son socle après découpe de la couronne de l'incisive (à gauche) et du ramus mandibulaire (à droite).

B. Photographie d'un échantillon inclus dans un bloc de résine de type PMMA (flèche rouge : trait de pré-coupe dans la zone d'intérêt passant entre la 1ère et la 2ème molaire)

C. Images obtenues après reconstruction 3D au micro-scanner (Skyscan 1172, BRUKER, Anvers, Belgique) illustrant l'architecture osseuse et la morphologie radiculaire chez le rat par des coupes virtuelles dans le plan parasagittal (à gauche) et frontal (à droite).

D. Photographie d'une coupe tissulaire polie (épaisseur = 100µm) et scellée sur lame de verre.

D. Microspectromètre Confocal Raman

a) Principes et paramètres d'acquisition

Les spectres ont été acquis avec un microspectromètre LabRAM HR800 (HORIBA, Jobin Yvon, Villeneuve d'Ascq – France). Cet instrument est équipé (Figure 23) :

- d'une diode laser, source lumineuse excitatrice monochromatique (faisceau laser incident), de 785 nm
- d'un porte-échantillon motorisé à déplacement micrométrique selon les axes XYZ.
- d'un spectromètre équipé d'un réseau 300 traits qui donne une fenêtre spectrale comprise entre 200 et 1700 cm^{-1}
- d'un détecteur CCD (Capteur Charge-Coupled-Device) d'une taille de 1024x256 pixels pour collecter la diffusion Raman.
- et d'un ordinateur pour l'acquisition et le traitement des spectres Raman.

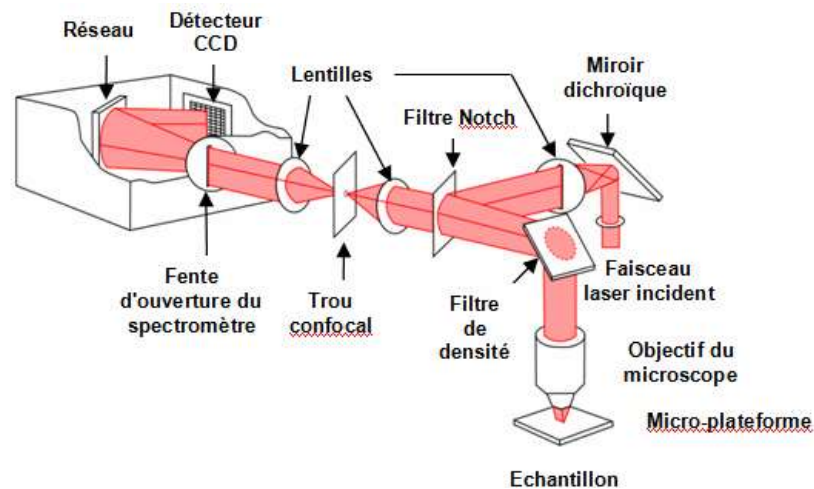


Figure 23 : Schéma de principe simplifié du microspectromètre confocal Raman

La résolution spectrale est de 4 cm^{-1} . Le temps d'acquisition par spectre a été fixé à 1 minute. L'acquisition des spectres a été faite avec un objectif 100x.0,9 NA.

Un total de 48 spectres par échantillon a été acquis de la manière suivante :

- 12 spectres dans l'os alvéolaire jeune
- 12 spectres dans l'os alvéolaire ancien
- 12 spectres dans l'os basal jeune
- 12 spectres dans l'os basal ancien

Un total de 1440 spectres a été acquis et traités sur l'ensemble des échantillons.

b) Pré-traitement

Tous les spectres Raman ont été traités à l'aide du logiciel Labspec (HORIBA, Jobin Yvon, France). Un filtre de lissage (Savitzky-Golay de largeur égale à 7 et d'ordre polynomial égal à 2), une suppression des raies cosmiques ainsi qu'une correction de la ligne de base (de degré 4) ont été appliqués à l'ensemble des spectres avant le calcul des paramètres physico-chimiques sur le logiciel Matlab® (The MathWorks, v7 2010a).

E. Paramètres Physico-Chimiques

Les paramètres physico-chimiques (PPC) caractérisant la composition et la structure osseuse ont été décrits dans la littérature [46,49,12,30]. 6 PPC ont été retenus pour cette étude :

- a) Le ratio minéral/organique : il mesure le contenu minéral osseux relatif et fournit une estimation de la minéralisation [4]. Il est calculé comme le ratio d'intensité de la bande associée à la vibration symétrique des phosphates (ν_1 PO_4^{3-} à 960 cm^{-1}) et de la bande associée aux vibrations des chaînes CH_2 des molécules de collagène (δCH_2 à 1450 cm^{-1}). Cette bande à 1450 cm^{-1} a été choisie en raison de sa faible sensibilité à l'orientation moléculaire comparée à celle des amides I à 1670 cm^{-1} [35].
- b) Le taux de substitution ionique carbonatée (de type B) : il représente le niveau de substitution relatif en ion carbonate avec un ion phosphate (site B) au sein de la maille cristalline de l'apatite biologique. Il est calculé comme le ratio d'intensité entre la bande associée à la vibration symétrique des carbonates (ν_1 CO_3^{2-} à 1071 cm^{-1}) et la bande de vibration symétrique des phosphates (ν_1 PO_4^{3-} à 960 cm^{-1})
- c) La cristallinité : elle fournit une estimation de la taille et de la perfection des cristaux apatitiques (phosphates de calcium). Elle est calculée comme l'inverse de la largeur à mi-hauteur de la bande associée à la vibration symétrique des phosphates (ν_1 PO_4^{3-} à 960 cm^{-1}).
- d) Le taux relatif de phosphate monohydrogéné (HPO_4^{2-}) : il reflète la conversion de précurseurs non apatitiques en minéraux apatitiques par perte de leur couche hydratée de surface. Ce taux est un témoin inverse de la maturation du

compartiment minéral osseux. Il est calculé comme le ratio d'intensité de la bande associée à la vibration asymétrique des HPO_4 ($\nu_3 \text{HPO}_4^{2-}$ à 1004 cm^{-1}) et de la bande associée à la vibration symétrique des PO_4^{3-} ($\nu_1 \text{PO}_4^{3-}$ à 960 cm^{-1}).

- e) Le ratio hydroxyproline/proline : il permet une approche indirecte de la maturation extra-cellulaire du collagène de type I (modifications post-traductionnelles), impliquée dans le processus de minéralisation, autrement dit dans la capacité du tissu osseux à se minéraliser. Il est calculé comme le ratio d'intensité entre les bandes associées aux vibrations de l'hydroxyproline (879 cm^{-1}) et de la proline (854 cm^{-1})[12].
- f) Le taux de "collagen cross-links" : évalue la quantité relative de pontage croisé de collagène intra et inter-fibrillaire au sein du compartiment matriciel osseux et donc appréhende le degré de maturité et d'organisation du collagène, charpente au compartiment minéral lui conférant des propriétés matérielles et mécanique propre. Il est calculé comme le ratio d'intensité entre la bande associée aux vibrations des liaisons croisées matures de type "pyridinoline (Pyr) cross-links" trivalent (à $\sim 1660 \text{ cm}^{-1}$) et celle associée aux vibrations des liaisons croisées immatures du collagène "dehydroxylysinonorleucine (deH-DHLNL) cross-links" divalent (à $\sim 1690 \text{ cm}^{-1}$) [52,53,68].

Tous ces PPC sont associés à l'évaluation de la composition/structure et représentent des marqueurs spectroscopiques qualitatifs osseux à l'échelle moléculaire.

F. Analyses statistiques

Les résultats sont présentés sous forme d'histogrammes illustrant les valeurs moyennes (+/- déviation standard) de chaque PPC calculé. Une analyse comparée des valeurs moyennes des PPC obtenues entre les mandibules des 2 groupes (S et ZA) a été réalisée. Les comparaisons ont été faites 2 à 2 avec un test paramétrique t de Student pour échantillons indépendants.

3 types de comparaisons ont été évalués :

1. l'effet de l'administration d'acide zolédronique sur la composition osseuse en secteur mandibulaire denté indépendamment du remodelage osseux et du site anatomique : comparaison des valeurs moyennes de chaque PPC obtenues dans le groupe S *versus* celles obtenues dans le groupe ZA à âge tissulaire équivalent et site anatomique identique.
2. l'effet de l'âge tissulaire sur la composition osseuse : comparaison des valeurs moyennes de chaque PPC obtenues dans l'os jeune (marqué) *versus* celles obtenues dans l'os plus ancien (non marqué) dans les 2 groupes (S et ZA) et dans les 2 sites anatomiques alvéolaire et basal.
3. l'effet de la zone anatomique (alvéolaire ou basal), plus ou moins soumise à des sollicitations mécaniques, sur la composition osseuse : comparaison des valeurs moyennes de chaque PPC obtenues au niveau alvéolaire *versus* celles obtenues au niveau basal à âge tissulaire équivalent.

Toutes les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel JMP-10 (SAS Institute). Le seuil de significativité statistique a été fixé à 5% pour toutes les analyses.

3. Résultats

A. Microscopie Confocale à balayage laser

L'analyse par microscopie confocale à balayage laser des coupes tissulaires en secteur molaire montre, après superposition des images, la présence de zones de co-localisation de marquage calcéine (vert) et déméclocycline (rouge) dans l'os alvéolaire (ostéons proches de la chaîne vasculaire nourricière des molaires) et basal ainsi que dans l'os périphérique périosté (Figures 24, 25). Elle montre également la présence de zones marquées au niveau desmodontal des molaires et de l'incisive ainsi que dans les tissus dentaires (dentine des molaires), et notamment à la jonction amélo-dentinaire de l'incisive (en coupe transversale, dans la partie basale). Ces zones sont similaires à celles que Kozloff avait décrites comme sites de fixation préférentiels des bisphosphonates dans la mandibule [38].

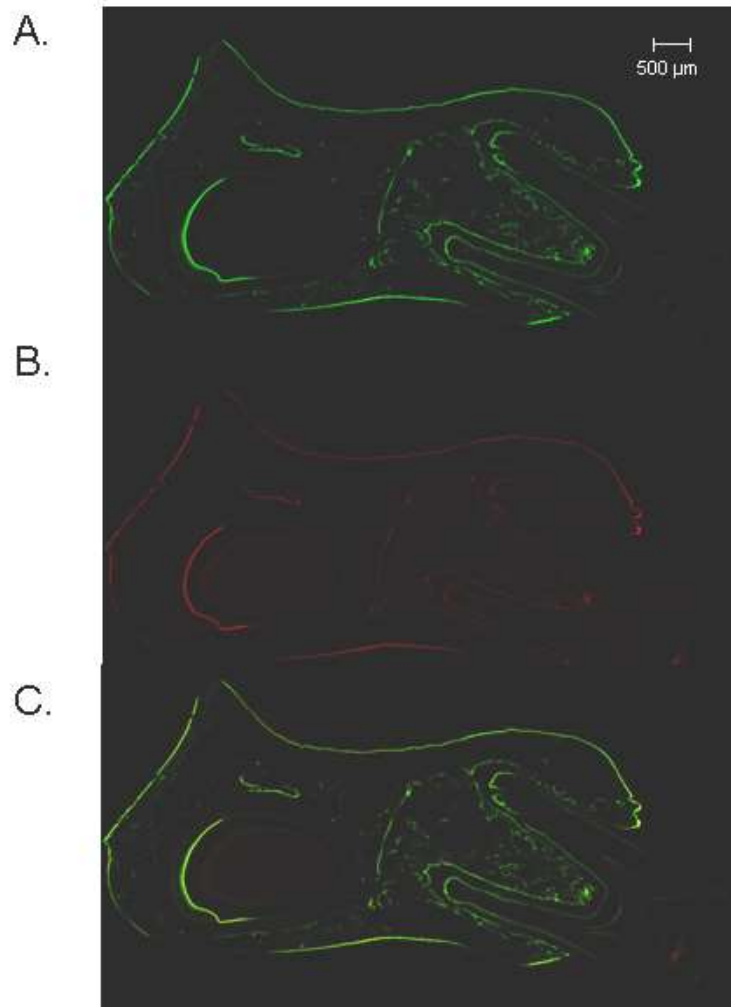


Figure 24: Image en microscopie à balayage laser de chaque marquage fluorescent en l'absence de lumière transmise sur une coupe tissulaire frontale d'une mandibule de rat passant par les racines mésiales de la 1ère molaire (A : Calcéine, B : Déméclocycline) et la superposition des 2 (C).

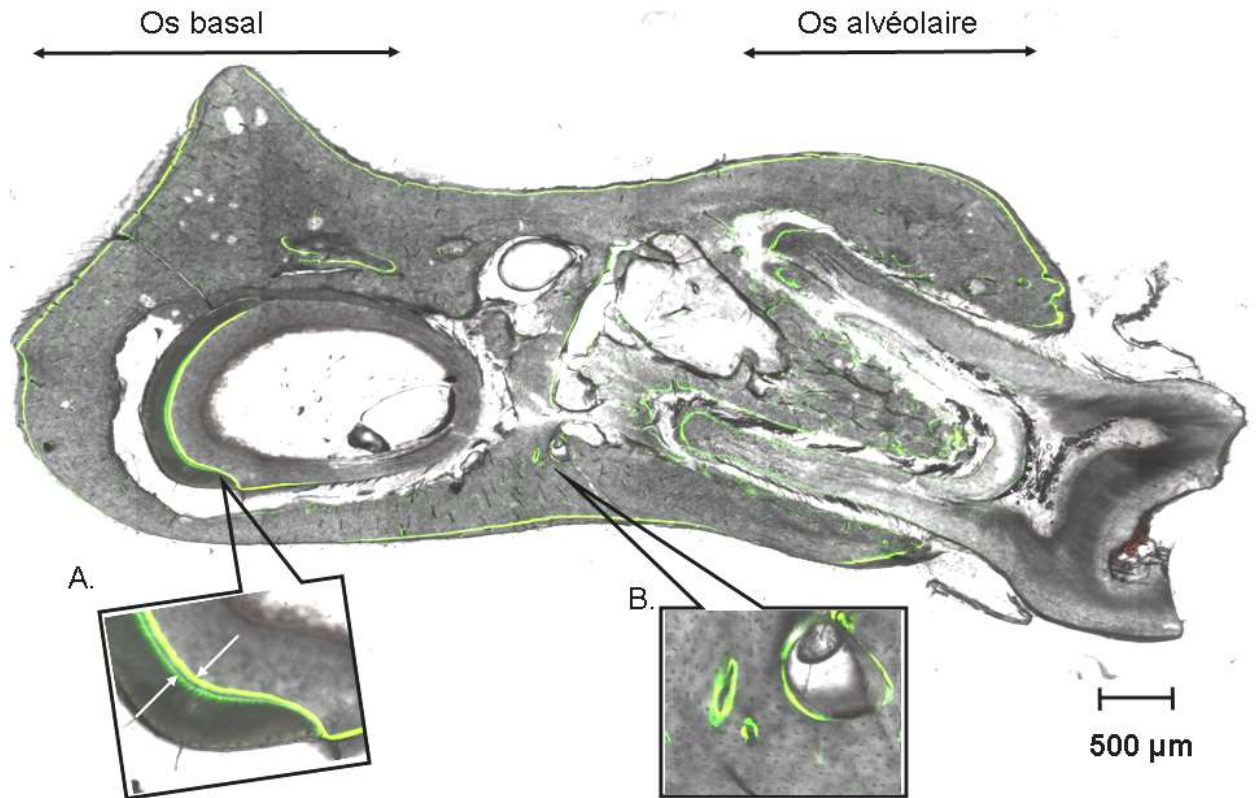


Figure 25: Image en microscopie à balayage laser de la même coupe tissulaire superposée avec la lumière transmise.

A. Grossissement montrant la jonction amélo-dentinaire de l'incisive de rongeur à croissance continue. Chaque marque fluorescente (flèches blanches) révèle le front de minéralisation actif au moment où la dose de tétracycline a été administrée.

B. Grossissement montrant des ostéons marqués (os jeune).

B. Paramètres physico-chimiques (PPC)

a) Description spectrale et attribution de bandes

La figure 26 présente le profil classique d'un spectre Raman d'os dans la fenêtre spectrale comprise entre 400 et 1800 cm^{-1} . Ce spectre est représentatif de ceux obtenus dans cette étude. Les principales bandes pour le calcul des PPC sont marquées en bleu pour celles associées au compartiment minéral et en vert pour celles associées au compartiment organique. La vibration symétrique des ν_1 phosphates (PO_4^{3-}) à 960 cm^{-1} est la signature la plus marquée du minéral osseux. Les vibrations antisymétriques ν_2 et ν_4 des phosphates sont visibles respectivement à $\sim 438 \text{ cm}^{-1}$ et $\sim 589 \text{ cm}^{-1}$. La bande à 1003 cm^{-1} est associée aux HPO_4^{2-} et à la phénylalanine. La bande à $\sim 1071 \text{ cm}^{-1}$ est attribuée aux carbonates substitués de type B au sein de la maille cristalline (remplacement d'un carbonate à la place d'un phosphate). Les larges bandes situées dans les régions de fréquence plus élevée sont associées aux amides III ($\sim 1256 \text{ cm}^{-1}$), aux

déformations des CH_2 ($\sim 1451 \text{ cm}^{-1}$) et aux amides I ($\sim 1660 \text{ cm}^{-1}$). Les amides I (C=O) et III (C-N, N-H, CH_3) sont essentiellement liés à la présence de collagène et révèlent la structure périodique peptidique du collagène (structure II). Le massif spectral attribué aux étirements des C-H est également lié à la présence de collagène.

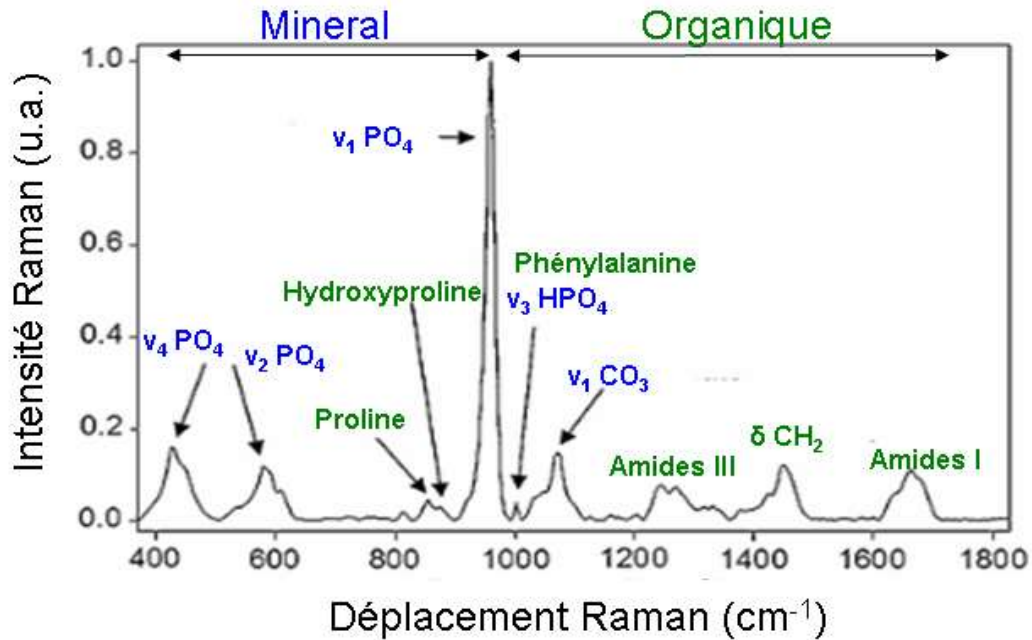


Figure 26: Attribution des principales bandes pour le calcul des paramètres physico-chimiques (PPC) dans la fenêtre spectrale 400-1800 cm^{-1} (en bleu, celles associées au compartiment minéral; en vert, celles associées au compartiment organique), d'après Morris [45]

b) Observation des modifications de composition osseuse entre les 2 groupes S et ZA : effet de l'administration du zolédronate sur les PPC

Chaque comparaison 2 à 2 a été réalisée à âge tissulaire équivalent et pour une même zone (alvéolaire ou basale) entre os traités (ZA) et contrôles (S), soit pour exemple entre os « S_alv_jeune » et « ZA_alv_jeune » (Figure 27), pour évaluer les modifications de composition induites après administration d'acide zolédronique.

Aucune différence significative dans les PPC étudiés n'est observée entre le groupe ZA et le groupe S.

c) Observation des modifications de composition osseuse en fonction de l'âge tissulaire : effet de l'âge tissulaire sur les PPC.

Chaque comparaison 2 à 2, au sein des groupes S et ZA, a été réalisée entre os "alvéolaire_jeune" *versus* os "alvéolaire_ancien" d'une part, et entre os "basal_jeune" *versus* os "basal_ancien" d'autre part, pour évaluer les modifications de composition/structure induites avec l'âge tissulaire (Figure 27).

On observe une augmentation significative ($p < 0.001$) du ratio minéral / organique (~ 35%), de la cristallinité (~ 10%) et du ratio hydroxyproline / proline (~ 8%) dans l'os ancien par rapport à l'os jeune aussi bien dans l'os alvéolaire que dans l'os basal, et ce, dans les 2 groupes S et ZA (Figure 27 A. B. E). Le ratio CO_3/PO_4 ne montre aucune différence significative entre os jeune et os ancien quels que soient les groupes comparés (Figure 27 C). Le ratio HPO_4/PO_4 diminue de manière significative (> 50%) dans l'os ancien ($p < 0.001$) par rapport à l'os jeune, aussi bien dans l'os alvéolaire que dans l'os basal, et ce, dans les 2 groupe S et ZA (Figure 27 D). Enfin, le taux de collagen cross-links augmente de manière significative uniquement dans l'os basal dans le groupe S ($p = 0,007$) et dans le groupe ZA ($p = 0,0279$). Cependant, aucune différence significative entre os jeune et os ancien dans le taux de collagen cross-links n'a été observée au niveau de l'os alvéolaire tant dans le groupe S que dans le groupe ZA (Figure 27 F).

d) Observation des modifications de composition osseuse en fonction de la physiologie locale : effet du site anatomique sur les PPC

Chaque comparaison 2 à 2, au sein des groupes S et ZA, a été réalisée entre os "alvéolaire_jeune" *versus* os "basal_jeune" d'une part, et entre os "alvéolaire_ancien" *versus* os "basal_ancien" d'autre part, pour évaluer les modifications de composition entre les sites anatomiques alvéolaire et basal (Figure 27).

Aucune différence significative n'a été mise en évidence entre os alvéolaire et os basal concernant le ratio minéral / organique quels que soient les groupes comparés (Figure 27 A).

Aucune différence significative n'a été observée entre os "alvéolaire_jeune" et os "basal_jeune" dans le groupe S concernant la cristallinité ($p = 0,0573$).

Cependant, une augmentation significative de la cristallinité a été observée entre os

"alvéolaire_jeune" et os "basal_jeune" dans le groupe ZA ($p = 0,0144$), ainsi que dans les os "alvéolaire_ancien" et "basal_ancien" aussi bien dans le groupe S ($p = 0,0197$) que dans le groupe ZA ($p = 0,0032$) (Figure 27 B). Aucune différence significative dans le taux de carbonatation n'a été constatée entre os alvéolaire et os basal, quels que soient les groupes comparés (Figure 27 C).

Une tendance statistiquement significative à l'augmentation a été constatée dans le ratio $\text{HPO}_4 / \text{PO}_4$ entre os "alvéolaire_jeune" et os "basal_jeune" uniquement dans le groupe S ($p = 0,0365$). Toutes les autres comparaisons ont révélé une absence de différence significative dans le ratio $\text{HPO}_4 / \text{PO}_4$ entre os alvéolaire et os basal (Figure 27 D).

Aucune différence significative dans le ratio hydroxyproline / proline n'a été mise en évidence dans l'os alvéolaire et basal jeune à l'exception d'une tendance statistiquement significative à l'augmentation constatée entre os "alvéolaire_ancien" et os "basal_ancien", aussi bien dans le groupe S ($p = 0,0434$) que ZA ($p = 0,0128$), (Figure 27 E).

Enfin, aucune différence significative n'a été mise en évidence dans le taux de collagen cross-links entre os alvéolaire et os basal quelles que soient les comparaisons faites (Figure 27 F).

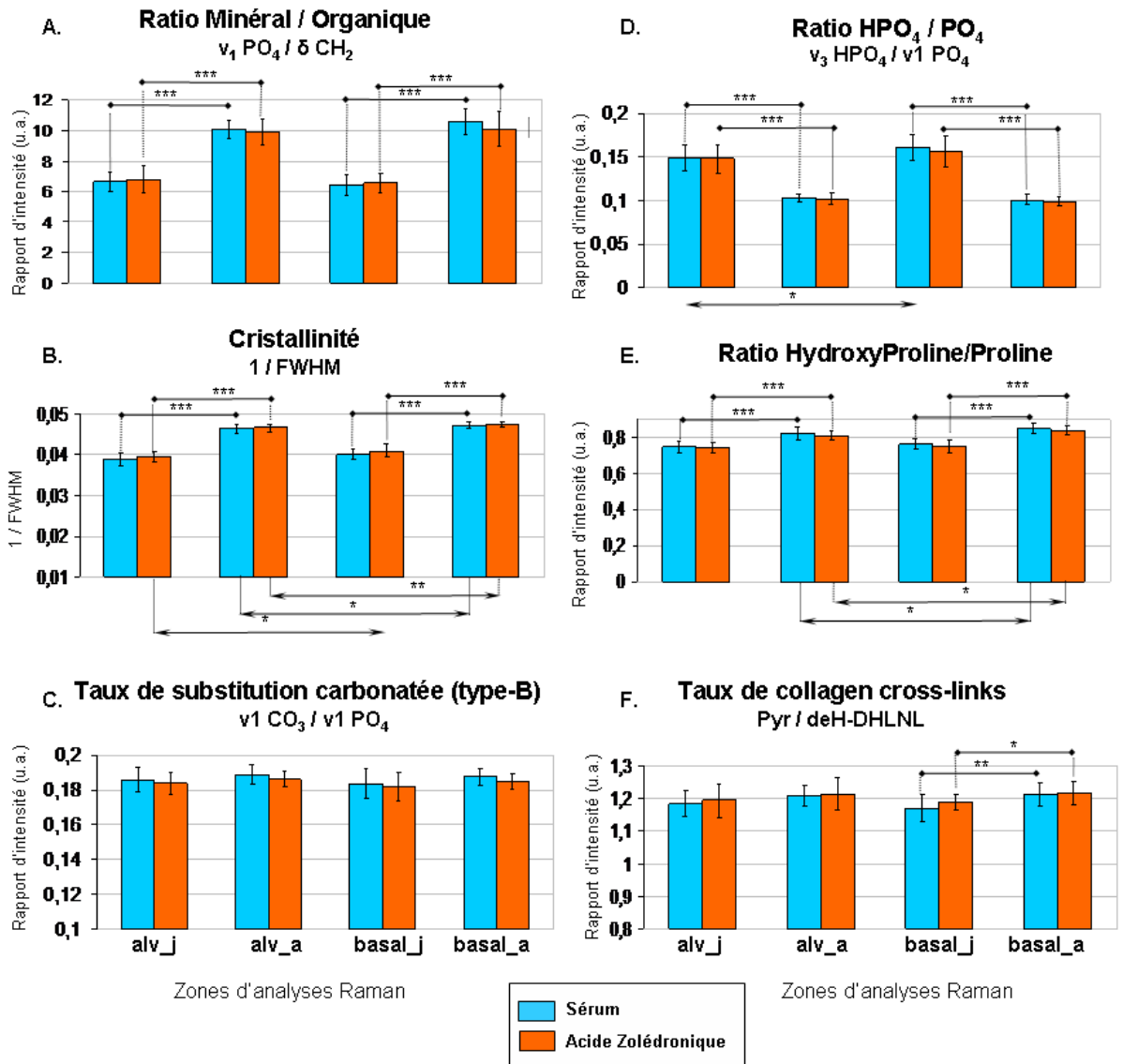


Figure 27 : Comparaison des valeurs moyennes des PPC obtenus dans les 2 groupes S et ZA en fonction des sites anatomiques et de l'âge tissulaire (se référer à la légende des abscisses des histogrammes du bas : zones d'analyses Raman)

◆—◆ représente les comparaisons 2 à 2 en fonction de l'âge tissulaire avec une différence significative (au dessus)

◀—▶ représente les comparaison 2 à 2 en fonction du site anatomique avec une différence significative (en dessous)

seuil de significativité statistique :

* : $p < 0.05$

** : $p < 0.01$

*** : $p < 0.001$

4. Discussion

Ce travail est le premier à étudier la composition physico-chimique en Raman suite à l'administration de zoledronate à forte dose, au niveau mandibulaire chez le rat. De manière générale, un des obstacles à contourner, lorsqu'on évalue les paramètres qualitatifs osseux, est l'hétérogénéité du tissu à l'échelle microscopique. C'est pourquoi, il apparaît nécessaire de différencier les âges tissulaires et de comparer les paramètres physico-chimiques à âge tissulaire équivalent [29]. De cette manière, on peut procéder à des comparaisons entre groupes ZA et S en s'affranchissant du facteur confondant lié à l'âge tissulaire.

Ces comparaisons entre groupes ZA et S ne montrent aucune différence significative dans les PPC étudiés.

Des études micro-architecturales chez la souris ovariectomisée, ont observé un nivellement de la BMD après traitement aux BPs [11]. A l'échelle moléculaire, d'autres études ont montré que la minéralisation et le taux de collagen cross-links augmentaient après traitement aux BPs dans les côtes, tibias et vertèbres de chiennes [2,31]. L'effet des BPs sur les PPC a été étudié chez l'humain, essentiellement dans un contexte pathologique, sur des biopsies de crêtes iliaques prélevées chez des femmes ostéoporotiques traitées par BPs. Les études s'accordent à dire que les effets délétères de l'ostéoporose sont compensés après un traitement aux BPs à long terme (de 1 à 5 ans) par une augmentation du taux de minéralisation [29,57] et de la maturité collagénique [24].

Nos résultats diffèrent de ceux obtenus suite à une administration à long terme de BPs. L'hétérogénéité tissulaire n'a pas toujours été prise en considération dans les précédentes études. Or, des différences de composition osseuse sont observées avec l'âge tissulaire et la zone anatomique [23,71,30]. Il semble donc que ces 2 paramètres soient importants à prendre en compte.

Nos résultats montrent des différences significatives entre os jeunes et os anciens. Aussi bien dans le groupe S que ZA, on observe une augmentation de la minéralisation (~35 %), de la cristallinité (~10 %) et du taux d'hydroxyproline (~8 %) et une diminution du taux de phosphate monohydrogéné (> 50 %).

L'os est donc plus minéralisé avec des cristaux plus volumineux (cristallinité), et une phase organique collagénique mieux structurée avec l'âge tissulaire, tandis que l'os jeune présente encore une phase minérale immature (couche hydratée périphérique), ce qui est conforme aux précédents travaux sur modèles animaux et chez l'humain sur d'autres sites de mesure publiés dans la littérature. Cependant, aucune différence significative dans le taux de carbonatation n'a été observée entre os jeunes et os anciens. Or, dans la littérature, les apatites osseuses apparaissent plus carbonatées avec l'âge tissulaire en spectroscopie infra-rouge et Raman. Par ailleurs, l'augmentation du taux de collagen cross-links, décrit dans la littérature sur d'autres sites du squelette (crêtes iliaques, vertèbres, fémurs...), n'apparaît pas significative dans l'os alvéolaire mais l'est relativement faiblement dans l'os basal. Ces différences pourraient être associées à une spécificité de la matrice collagénique mandibulaire qui comporte moins de cross-links matures (moins d'hydroxylation de la lysine, AA précurseur des liaisons croisées) malgré une quantité de matrice organique plus importante par rapport aux os longs [42].

Outre les différences constatées liées à l'âge tissulaire, il semble aussi que la physiologie locale joue un rôle dans les modifications de composition et de maturation osseuse. La biodistribution tissulaire des BPs diffère avec une fixation préférentielle dans des zones à fort taux de remodelage [38,73]. Peu de données existent sur les modifications de composition associées aux BPs dans ces sites. Chez l'humain, l'os trabéculaire présente un taux de remodelage proportionnellement plus grand et peut atteindre jusqu'à 5 à 10 fois celui de l'os cortical chez l'adulte humain [29]. La mandibule présente des différences par rapport à la crête iliaque. En effet, elle a un taux de remodelage plus important et est soumise à des sollicitations mécaniques locales différentes. De plus, la concentration en BPs dans les mandibules y est plus élevée. L'étude de Kozloff montre que les BPs sont localisés préférentiellement, dans la mandibule de rat, au niveau du condyle mandibulaire et dans l'os alvéolaire adjacent au secteur molaire, région d'apparition fréquente de lésions ostéonécrotiques [38].

L'analyse comparative des paramètres physico-chimiques entre zones (alvéolaire *versus* basale) dans les mandibules traitées et contrôles révèle également des différences, décrites pour la 1^{ère} fois, témoignant d'une possible influence de la physiologie locale (sollicitations mécaniques liée à l'activité masticatoire) sur la composition osseuse au niveau mandibulaire.

Dans le groupe S, nos résultats montrent une tendance à l'augmentation de la cristallinité et du ratio hydroxyproline/proline dans l'os basal par rapport à l'os alvéolaire. Il semble donc qu'il y'ait une hétérogénéité de maturation tissulaire entre les 2 types d'os, alvéolaire et basal, comme décrit entre os cortical *versus* os spongieux dans les os longs.

Dans le groupe ZA, nos résultats vérifient les mêmes tendances; à savoir que l'os basal est également plus cristallisé et contient davantage d'hydroxyproline que l'os alvéolaire.

5. Conclusion et perspectives

En dehors de toutes circonstances pathologiques, l'objectif principal de cette étude était de déterminer l'impact à court terme du ZA sur la qualité osseuse mandibulaire à l'échelle moléculaire.

Nos résultats montrent l'absence d'effets du ZA sur la composition osseuse par rapport au groupe S indépendamment de l'âge tissulaire ou de la zone anatomique à cette échelle. D'un point de vue plus global, ce travail a soulevé plusieurs points importants à prendre en considération dont la hiérarchie structurale de l'os à l'échelle microscopique. En effet, des différences de composition/structure ont été observées en fonction de l'âge du tissu et du site anatomique.

Cependant, il est nécessaire d'évaluer l'impact à plus long terme du ZA afin de préciser les effets de celui-ci sur la qualité osseuse mandibulaire à l'échelle moléculaire en portant l'accent sur les modifications du compartiment organique, moins bien documentées à ce jour. Des études complémentaires faisant varier les doses et modalités d'administration du ZA semblent nécessaires pour une compréhension plus globale du comportement osseux suite à l'administration des BPs dans le squelette.

De plus, il serait intéressant de compléter et d'affiner ces premiers résultats en ayant recours à une analyse chimiométrique, traitement statistique des spectres entiers, afin d'en dégager les caractéristiques propres à chaque groupe. Dans un second temps, l'étude de l'impact du ZA sur la qualité osseuse nécessite de se questionner sur les effets du ZA sur les autres niveaux d'organisation du tissu osseux (micro-architecture et biomécanique).

Conclusion générale

Les bisphosphonates constituent le groupe de médicaments le plus utilisé dans le traitement de l'ostéoporose, mais aussi dans celui d'autres affections de résorption osseuse excessive. Ces traitements étant souvent administrés de manière chronique, il convient donc d'en connaître les effets sur les propriétés de la matrice osseuse à court et plus long terme. De rares cas de complications liées à une utilisation prolongée de BPs avec des dosages élevés ont été rapportés (ex : fractures fémorales atypiques, ostéonécrose des maxillaires). Ces complications pourraient être associées à une altération de la qualité osseuse, en particulier au niveau moléculaire.

Cette étude permet une meilleure compréhension des éléments à prendre en considération dans l'approche moléculaire de la qualité osseuse.

Les principales conclusions de cette thèse peuvent être résumées comme il suit :

1. La microspectrométrie Raman permet de décrire les modifications de composition et de structure osseuses durant les phases de maturation précoces de la formation osseuse.
2. On note une absence d'effets du ZA à court terme sur la qualité osseuse à l'échelle moléculaire indépendamment du remodelage osseux chez le rat.
3. La composition osseuse varie avec l'âge et le type tissulaire (localisation anatomique) chez le rat. L'environnement et la physiologie locale pourrait jouer un rôle dans les modifications observées.
4. Des investigations complémentaires sont nécessaires pour évaluer les effets du ZA sur la qualité osseuse à plus long terme, ainsi que sur les autres niveaux d'organisation du tissu osseux.
5. De même, l'étude de l'impact du ZA sur la qualité osseuse nécessite de se questionner sur les effets du ZA sur les autres niveaux d'organisation du tissu osseux (micro-architecture et biomécanique).
6. Enfin, des études complémentaires faisant varier les doses et modalités d'administration du ZA, voir la comparaison du ZA avec d'autres BPs sont nécessaires pour une compréhension plus globale du comportement osseux suite à l'administration des BPs dans le squelette.

Références bibliographiques

1. Allen MR. The effects of bisphosphonates on jaw bone remodeling, tissue properties, and extraction healing. *Odontology*. janv 2011;99(1):8-17.
2. Allen MR, Gineyts E, Leeming DJ, Burr DB, Delmas PD. Bisphosphonates alter trabecular bone collagen cross-linking and isomerization in beagle dog vertebra. *Osteoporos Int*. 1 mars 2008;19(3):329-37.
3. Allen MR, Kubek DJ, Burr DB. Cancer treatment dosing regimens of zoledronic acid result in near-complete suppression of mandible intracortical bone remodeling in beagle dogs. *J Bone Miner Res*. 1 janv 2010;25(1):98-105.
4. Bala Y, Farlay D, Boivin G. Bone mineralization: from tissue to crystal in normal and pathological contexts. *Osteoporos Int*. 1 août 2013;24(8):2153-66.
5. Bala Y, Farlay D, Delmas PD, Meunier PJ, Boivin G. Time sequence of secondary mineralization and microhardness in cortical and cancellous bone from ewes. *Bone*. avr 2010;46(4):1204-12.
6. BALA Y, Maxime. Etude multi-échelles des effets osseux des bisphosphonates au cours du traitement de l'ostéoporose ménopausique. [Lyon]: Université Claude BERNARD (Lyon 1); 2011.
7. Bi X, Patil CA, Lynch CC, Pharr GM, Mahadevan-Jansen A, Nyman JS. Raman and mechanical properties correlate at whole bone- and tissue-levels in a genetic mouse model. *J Biomech*. 11 janv 2011;44(2):297-303.
8. Boskey A. Bone mineral crystal size. *Osteoporos Int*. 1 sept 2003;14(5):16-21.
9. Boskey AL, Coleman R. Aging and Bone. *J Dent Res*. 5 oct 2010;89(12):1333-48.
10. Boussein ML. Bone quality: where do we go from here? *Osteoporos Int*. 1 sept 2003;14(0):118-27.
11. Brouwers JEM, Lambers FM, Gasser JA, Rietbergen B van, Huiskes R. Bone Degeneration and Recovery after Early and Late Bisphosphonate Treatment of Ovariectomized Wistar Rats Assessed by In Vivo Micro-Computed Tomography. *Calcif Tissue Int*. 1 mars 2008;82(3):202-11.
12. Buckley K, Matousek P, Parker AW, Goodship AE. Raman spectroscopy reveals differences in collagen secondary structure which relate to the levels of mineralisation in bones that have evolved for different functions. *J Raman Spectrosc*. 1 sept 2012;43(9):1237-43.
13. Burket JC, Brooks DJ, MacLeay JM, Baker SP, Boskey AL, van der Meulen MCH. Variations in nanomechanical properties and tissue composition within trabeculae from an ovine model of osteoporosis and treatment. *Bone*. janv 2013;52(1):326-36.
14. Burr D. Microdamage and bone strength. *Osteoporos Int*. 1 sept 2003;14(5):67-72.

15. Busa B, Miller LM, Rubin CT, Qin Y-X, Judex S. Rapid Establishment of Chemical and Mechanical Properties during Lamellar Bone Formation. *Calcif Tissue Int.* 1 déc 2005;77(6):386-94.
16. Cazalbou S, Eichert D, Ranz X, Drouet C, Combes C, Harmand MF, et al. Ion exchanges in apatites for biomedical application. *J Mater Sci Mater Med.* 1 mai 2005;16(5):405-9.
17. Chappard D, Baslé MF, Legrand E, Audran M. New laboratory tools in the assessment of bone quality. *Osteoporos Int.* août 2011;22(8):2225-40.
18. Chappard D, Baslé MF, Legrand E, Audran M. New laboratory tools in the assessment of bone quality. *Osteoporos Int.* 1 août 2011;22(8):2225-40.
19. Coxon FP, Thompson K, Roelofs AJ, Ebetino FH, Rogers MJ. Visualizing mineral binding and uptake of bisphosphonate by osteoclasts and non-resorbing cells. *Bone.* mai 2008;42(5):848-60.
20. Cremers S, Papapoulos S. Pharmacology of bisphosphonates. *Bone.* juill 2011;49(1):42-9.
21. Currey JD. The many adaptations of bone. *J Biomech.* oct 2003;36(10):1487-95.
22. Donnelly E. Methods for Assessing Bone Quality: A Review. *Clin Orthop Relat Res.* 30 nov 2010;469(8):2128-38.
23. Donnelly E, Boskey AL, Baker SP, van der Meulen MCH. Effects of tissue age on bone tissue material composition and nanomechanical properties in the rat cortex. *J Biomed Mater Res A.* 2010;92A(3):1048-56.
24. Durchschlag E, Paschalis EP, Zoehrer R, Roschger P, Fratzl P, Recker R, et al. Bone Material Properties in Trabecular Bone From Human Iliac Crest Biopsies After 3- and 5-Year Treatment With Risedronate. *J Bone Miner Res.* 1 oct 2006;21(10):1581-90.
25. Eyre DR, Weis MA. Bone Collagen: New Clues to Its Mineralization Mechanism from Recessive Osteogenesis Imperfecta. *Calcif Tissue Int.* 1 oct 2013;93(4):338-47.
26. Farlay D, Panczer G, Rey C, Delmas PD, Boivin G. Mineral maturity and crystallinity index are distinct characteristics of bone mineral. *J Bone Miner Metab.* 22 janv 2010;28(4):433-45.
27. Fleisch H. Bisphosphonates--history and experimental basis. *Bone.* 1987;8 Suppl 1:S23-8.
28. Fratzl P, Gupta HS, Paschalis EP, Roschger P. Structure and mechanical quality of the collagen?mineral nano-composite in bone. *J Mater Chem.* 2004;14(14):2115.
29. Gamsjaeger S, Buchinger B, Zwettler E, Recker R, Black D, Gasser JA, et al. Bone material properties in actively bone-forming trabeculae in postmenopausal women with osteoporosis after three years of treatment with once-yearly Zoledronic acid. *J Bone Miner Res.* 2011;26(1):12-8.

30. Goodyear SR, Gibson IR, Skakle JMS, Wells RPK, Aspden RM. A comparison of cortical and trabecular bone from C57 Black 6 mice using Raman spectroscopy. *Bone*. mai 2009;44(5):899-907.
31. Gourion-Arsiquaud S, Allen MR, Burr DB, Vashishth D, Tang SY, Boskey AL. Bisphosphonate treatment modifies canine bone mineral and matrix properties and their heterogeneity. *Bone*. mars 2010;46(3):666-72.
32. Gourion-Arsiquaud S, Burket JC, Havill LM, DiCarlo E, Doty SB, Mendelsohn R, et al. Spatial Variation in Osteonal Bone Properties Relative to Tissue and Animal Age. *J Bone Miner Res*. juill 2009;24(7):1271-81.
33. Henneman ZJ, Nancollas GH, Ebetino FH, Russell RGG, Phipps RJ. Bisphosphonate binding affinity as assessed by inhibition of carbonated apatite dissolution in vitro. *J Biomed Mater Res A*. 2008;85A(4):993-1000.
34. Juillard A, Falgayrac G, Cortet B, Vieillard M-H, Azaroual N, Hornez J-C, et al. Molecular interactions between zoledronic acid and bone: An in vitro Raman microspectroscopic study. *Bone*. nov 2010;47(5):895-904.
35. Kazanci M, Roschger P, Paschalis EP, Klaushofer K, Fratzl P. Bone osteonal tissues by Raman spectral mapping: Orientation-composition. *J Struct Biol*. déc 2006;156(3):489-96.
36. Kivirikko KI, Myllylä R. Post-Translational Processing of Procollagens. *Ann N Y Acad Sci*. 1 déc 1985;460(1):187-201.
37. Knott L, Bailey AJ. Collagen cross-links in mineralizing tissues: A review of their chemistry, function, and clinical relevance. *Bone*. mars 1998;22(3):181-7.
38. Kozloff KM, Volakis LI, Marini JC, Caird MS. Near-infrared fluorescent probe traces bisphosphonate delivery and retention in vivo. *J Bone Miner Res*. 1 août 2010;25(8):1748-58.
39. Landis WJ. The strength of a calcified tissue depends in part on the molecular structure and organization of its constituent mineral crystals in their organic matrix. *Bone*. mai 1995;16(5):533-44.
40. LEROY G, PENEL G, REY C, LAFFORGUE P, BRES E. Polarized Micro-Raman Study of Fluorapatite Single Crystals. *Appl Spectrosc*. 2000;54(10):7.
41. Marx RE. A Decade of Bisphosphonate Bone Complications: What It Has Taught Us About Bone Physiology. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2014;29(2):e247-58.
42. Matsuura T, Tokutomi K, Sasaki M, Katafuchi M, Mizumachi E, Sato H. Distinct Characteristics of Mandibular Bone Collagen Relative to Long Bone Collagen: Relevance to Clinical Dentistry. *BioMed Res Int*. 2014;2014:1-9.
43. Mavropoulos A, Rizzoli R, Ammann P. Different Responsiveness of Alveolar and Tibial Bone to Bone Loss Stimuli. *J Bone Miner Res*. 1 mars 2007;22(3):403-10.
44. Van der Meulen MCH, Jepsen KJ, Mikić B. Understanding bone strength: size isn't everything. *Bone*. août 2001;29(2):101-4.

45. Morris MD, Mandair GS. Raman Assessment of Bone Quality. *Clin Orthop Relat Res.* 30 nov 2010;469(8):2160-9.
46. Morris MD, Matousek P, éditeurs. *Emerging Raman applications and techniques in biomedical and pharmaceutical fields.* Heidelberg ; New York: Springer; 2010.
47. Myllyharju J, Kivirikko KI. Collagens, modifying enzymes and their mutations in humans, flies and worms. *Trends Genet.* janv 2004;20(1):33-43.
48. Nancollas GH, Tang R, Phipps RJ, Henneman Z, Gulde S, Wu W, et al. Novel insights into actions of bisphosphonates on bone: Differences in interactions with hydroxyapatite. *Bone.* mai 2006;38(5):617-27.
49. Olejnik C, Falgayrac G, During A, Vieillard MH, Maes JM, Cortet B, et al. Molecular alterations of bone quality in sequesters of bisphosphonates-related osteonecrosis of the jaws. *Osteoporos Int.* 1 oct 2013
50. Parfitt AM. Morphometry of bone resorption: Introduction and overview. *Bone.* mai 1993;14(3):435-41.
51. Pascaud P. Apatites nanocristallines biomimétiques comme modèles de la réactivité osseuse : étude des propriétés d'adsorption et de l'activité cellulaire d'un bisphosphonate, le tiludronate [Internet] [phd]. Université de Toulouse, Université Toulouse III - Paul Sabatier; 2012 [cité 23 juill 2014]. Disponible sur: <http://thesesups.ups-tlse.fr/1921/>
52. Paschalis EP, Shane E, Lyritis G, Skarantavos G, Mendelsohn R, Boskey AL. Bone Fragility and Collagen Cross-Links. *J Bone Miner Res.* 1 déc 2004;19(12):2000-4.
53. Paschalis EP, Verdelis K, Doty SB, Boskey AL, Mendelsohn R, Yamauchi M. Spectroscopic Characterization of Collagen Cross-Links in Bone. *J Bone Miner Res.* 1 oct 2001;16(10):1821-8.
54. Penel G, Leroy G, Rey C, Bres E. MicroRaman spectral study of the PO₄ and CO₃ vibrational modes in synthetic and biological apatites. *Calcif Tissue Int.* déc 1998;63(6):475-81.
55. Poelert S, Valstar E, Weinans H, Zadpoor AA. Patient-specific finite element modeling of bones. *Proc Inst Mech Eng [H].* 1 avr 2013;227(4):464-78.
56. Raccor BS, Sun J, Lawrence RF, Li L, Zhang H, Somerman MJ, et al. Quantitation of zoledronic acid in murine bone by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B.* sept 2013;935:54-60.
57. Recker RR, Delmas PD, Halse J, Reid IR, Boonen S, García-Hernandez PA, et al. Effects of Intravenous Zoledronic Acid Once Yearly on Bone Remodeling and Bone Structure. *J Bone Miner Res.* 1 janv 2008;23(1):6-16.
58. Reinholz GG, Getz B, Pederson L, Sanders ES, Subramaniam M, Ingle JN, et al. Bisphosphonates Directly Regulate Cell Proliferation, Differentiation, and Gene Expression in Human Osteoblasts. *Cancer Res.* 11 janv 2000;60(21):6001-7.

59. Rey C, Combes C, Drouet C, Glimcher MJ. Bone mineral: update on chemical composition and structure. *Osteoporos Int.* juin 2009;20(6):1013-21.
60. Riggs BL, Melton LJ, Robb RA, Camp JJ, Atkinson EJ, Oberg AL, et al. Population-Based Analysis of the Relationship of Whole Bone Strength Indices and Fall-Related Loads to Age- and Sex-Specific Patterns of Hip and Wrist Fractures. *J Bone Miner Res.* 1 févr 2006;21(2):315-23.
61. Rodan GA, Fleisch HA. Bisphosphonates: mechanisms of action. *J Clin Invest.* 15 juin 1996;97(12):2692-6.
62. Roux J-P, Wegrzyn J, Arlot ME, Guyen O, Delmas PD, Chapurlat R, et al. Contribution of Trabecular and Cortical Components to Biomechanical Behavior of Human Vertebrae: An Ex Vivo Study. *J Bone Miner Res.* 1 févr 2010;25(2):356-61.
63. Russell RGG. Bisphosphonates. *Ann N Y Acad Sci.* 2006;1068(1):367-401.
64. Russell RGG. Bisphosphonates: Mode of Action and Pharmacology. *PEDIATRICS.* 1 mars 2007;119(Supplement):S150-62.
65. Russell RGG. Bisphosphonates: The first 40 years. *Bone.* juill 2011;49(1):2-19.
66. Russell RGG, Watts NB, Ebtino FH, Rogers MJ. Mechanisms of action of bisphosphonates: similarities and differences and their potential influence on clinical efficacy. *Osteoporos Int.* 24 janv 2008;19(6):733-59.
67. Russell RGG, Watts NB, Ebtino FH, Rogers MJ. Mechanisms of action of bisphosphonates: similarities and differences and their potential influence on clinical efficacy. *Osteoporos Int.* 1 juin 2008;19(6):733-59.
68. Saito M, Marumo K. Collagen cross-links as a determinant of bone quality: a possible explanation for bone fragility in aging, osteoporosis, and diabetes mellitus. *Osteoporos Int.* févr 2010;21(2):195-214.
69. Skedros JG, Holmes JL, Vajda EG, Bloebaum RD. Cement lines of secondary osteons in human bone are not mineral-deficient: New data in a historical perspective. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol.* 1 sept 2005;286A(1):781-803.
70. Tower RJ, Campbell GM, Müller M, Will O, Glüer CC, Tiwari S. Binding Kinetics of a Fluorescently-Labeled Bisphosphonate as a Tool for Dynamic Monitoring of Bone Mineral Deposition *In Vivo.* *J Bone Miner Res.* mars 2014;n/a - n/a.
71. Turunen MJ. Spectroscopic Characterization of Bone Composition Alterations during Bone Formation, Maturation and Aging. University of Eastern Finland;
72. Viguier-Carrin S, Garnero P, Delmas PD. The role of collagen in bone strength. *Osteoporos Int.* 9 déc 2005;17(3):319-36.

73. Wen D, Qing L, Harrison G, Golub E, Akintoye S. Anatomic site variability in rat skeletal uptake and desorption of fluorescently labeled bisphosphonate. *Oral Dis.* 2011;17(4):427-32.
74. Yao F, LeGeros JP, LeGeros RZ. Simultaneous incorporation of carbonate and fluoride in synthetic apatites: Effect on crystallographic and physico-chemical properties. *Acta Biomater.* juill 2009;5(6):2169-77.
75. Yerramshetty JS, Akkus O. The associations between mineral crystallinity and the mechanical properties of human cortical bone. *Bone. mars* 2008;42(3):476-82.

Table des illustrations

FIGURE 1 : SCHEMA REPRESENTATIF DE LA CONFORMATION HELICOÏDALE DU COLLAGENE.....	19
FIGURE 2 : SCHEMA DES ETAPES INTRA- ET EXTRA-CELLULAIRES DE SYNTHÈSE ET DE MATURATION DU COLLAGÈNE (MODIFICATIONS POST-TRADUCTIONNELLES), ADAPTE DE MYLLYHARJU ET KIVIRIKKO, 2004 [47]	20
FIGURE 3: A. REPRESENTATION ET DIMENSIONS DU CRISTAL D'APATITE AVEC SES 3 AXES DE CROISSANCE	21
FIGURE 4 : IMAGE EN MEB DE FIBRES DE COLLAGÈNE (~ 1 μ DE DIAMÈTRE) MINÉRALISÉE AU SEIN D'UN OS TRABÉCULAIRE HUMAIN (x10 000) - PAUL HANSMA RESEARCH GROUP	22
FIGURE 5 : ECHANGES IONIQUES INTERVENANT ENTRE LES DIFFÉRENTS COMPARTIMENTS DU CRISTAL AU COURS DE SA MATURATION, ADAPTE DE CAZALBOU, 2005 [16] ET FARLAY, 2010 [26]	22
FIGURE 6 : SCHEMA REPRESENTANT LA NUCLEATION ET LA PROPAGATION DU MINÉRAL OSSEUX A PARTIR DES ZONES SOMBRES DU COLLAGÈNE, ADAPTE DE LANDIS, 1979[39]	24
FIGURE 7 : COUPE HISTOLOGIQUE DE TISSU OSSEUX OBSERVÉE EN MICROSCOPIE A BALAYAGE LASER PERMETTANT LA VISUALISATION D'UN MARQUAGE PAR LES CYCLINES (FLECHES BLANCHES), D'APRES CHAPPARD.D [17]	25
FIGURE 8 : SCHEMA DES DIFFÉRENTES ETAPES DU REMODELAGE OSSEUX ET DES PRINCIPAUX FACTEURS RÉGULANT LA BALANCE RESORPTION / FORMATION, ADAPTE DE PASCAUD [51] ET BALA [6]	27
FIGURE 9 : SCHEMA REPRESENTANT LE REMODELAGE AU SEIN D'UNE UNITÉ STRUCTURALE ÉLÉMENTAIRE CORTICALE ET TRABÉCULAIRE, ADAPTE DE PARFITT [50]	28
FIGURE 10: A. MICRORADIOGRAPHIES DE COUPES DE TISSU OSSEUX MANDIBULAIRE DE CHIEN APRES IMPLANTATION, D'APRES BRASSEUR.....	29
FIGURE 11: LES 5 NIVEAUX D'ORGANISATION DU TISSU OSSEUX ET LEURS ÉCHELLES, D'APRES CHAPPARD.D [17]	30
FIGURE 12: SCHEMA DE L'APPOSITION PÉRIOSTÉE ET DE LA RESORPTION ENDOSTÉALE PHYSIOLOGIQUES DANS LE CAS DE L'OSTÉOPOROSE., ADAPTE DE BOSKEY [9]	32
FIGURE 13 : MICRO-ARCHITECTURE OSSEUSE.....	32
FIGURE 14 : SCHEMA DE SYNTHÈSE DES TECHNIQUES D'ÉVALUATION DES DÉTERMINANTS DE LA QUALITÉ OSSEUSE A CHAQUE ÉCHELLE D'ORGANISATION DU TISSU OSSEUX, ADAPTE DE FRATZL [28] ET DONNELLY [22]	34
FIGURE 15 : LEÇONS TIRÉES DE L'UTILISATION DE ^{99m} Tc-BP COMME AGENT DE CONTRASTE EN SCINTIGRAPHIE OSSEUSE, ADAPTE DE RUSSELL [67] ET MARX [41]	35
FIGURE 16 : REPRESENTATION COMPARÉE DES STRUCTURES CHIMIQUES (FORMULES DÉVELOPPÉES) DU PPI (EN HAUT) ET DES BPs (EN BAS) AVEC LEURS CHAINES LATÉRALES R1 ET R2 DE COMPOSITION VARIABLE SELON LA MOLECULE, ADAPTEE DE RUSSELL [64].....	36
FIGURE 17 : CLASSIFICATION DES PRINCIPALES FAMILLES DE BPs, ADAPTE DE RUSSELL [67]	37
FIGURE 18: MODÈLE DE L'INTERACTION MOLECULAIRE DU ZOLEDRONATE AVEC L'APATITE OSSEUSE (A GAUCHE). SCHEMA REPRESENTATIF DE LA DISPERSION DES BPs DANS LE TISSU OSSEUX DEPUIS LA CHAÎNE NOURRICIÈRE VASCULAIRE MÉDULLAIRE (A DROITE), D'APRES RUSSELL [66]	38
FIGURE 19 : REPRESENTATION DE L'INTERNALISATION INTRA-CELLULAIRE D'ALÉNDRONATE MARQUÉ PAR LA CFSE, CARBOXY FLUORESCÉIN SUCCINIMIDYL ESTER (MARQUAGE VERT) D'APRES COXON [19]	39

FIGURE 20 : IMAGES DE LA REPARTITION DU TRACEUR DE BPS DANS LA MANDIBULE (FRFP : FAR-RED FLUORESCENT PAMIDRONATE), D'APRES KOZLOFF [38]	45
FIGURE 21 : SCHEMA DU PROTOCOLE EXPERIMENTAL	46
FIGURE 22 : ETAPES DE PREPARATION DES ECHANTILLONS OSSEUX AVANT ANALYSE EN MICROSCOPIE A BALAYAGE LASER ET MICROSPECTROSCOPIE RAMAN.	48
FIGURE 23 : SCHEMA DE PRINCIPE SIMPLIFIE DU MICROSPECTROMETRE CONFOCAL RAMAN	49
FIGURE 24: IMAGE EN MICROSCOPIE A BALAYAGE LASER DE CHAQUE MARQUAGE FLUORESCENT EN L'ABSENCE DE LUMIERE TRANSMISE SUR UNE COUPE TISSULAIRE FRONTALE D'UNE MANDIBULE DE RAT PASSANT PAR LES RACINES MESIALES DE LA 2EME MOLAIRE (A : CALCEINE, B : DEMECLOCYCLINE) ET LA SUPERPOSITION DES 2 (C).	53
FIGURE 25: IMAGE EN MICROSCOPIE A BALAYAGE LASER DE LA MEME COUPE TISSULAIRE SUPERPOSEE AVEC LA LUMIERE TRANSMISE.	54
FIGURE 26: ATTRIBUTION DES PRINCIPALES BANDES POUR LE CALCUL DES PARAMETRES PHYSICO-CHIMIQUES (PPC) DANS LA FENETRE SPECTRALE 400-1800 cm^{-1} (EN BLEU, CELLES ASSOCIEES AU COMPARTIMENT MINERAL; EN VERT, CELLES ASSOCIEES AU COMPARTIMENT ORGANIQUE), D'APRES MORRIS [45]	55
FIGURE 27 : COMPARAISON DES VALEURS MOYENNES DES PPC OBTENUS DANS LES 2 GROUPES S ET ZA EN FONCTION DES SITES ANATOMIQUES ET DE L'AGE TISSULAIRE (SE REFERER A LA LEGENDE DES ABSCISSES DES HISTOGRAMMES DU BAS : ZONES D'ANALYSES RAMAN)	58

Th. D. : Chir. Dent. : Lille 2 : 2014 – N°:

Impact à court terme de l'acide zolédronique sur la qualité osseuse
Approche expérimentale de la composition osseuse mandibulaire par microspectroscopie Raman

COUTEL Xavier - p. (70) ; ill. (27) ; réf. (75).

Domaines : *Biologie - Histologie - Pharmacologie*

Mots clés Rameau : Disphosphonates, Qualité osseuse, Microscopie de fluorescence, Spectroscopie Raman, Mandibule

Mots clés FMeSH : Disphosphonates, Os et tissu osseux - effets des médicaments et des substances chimiques, Microscopie de fluorescence, Analyse spectrale Raman, Mandibule

Résumé

Les bisphosphonates (BPs) sont des médicaments anti-résorptifs de première intention utilisés dans le traitement de pathologies osseuses bénignes (ostéoporose, maladie de Paget, ostéogenèse imparfaite) et malignes (myélome multiple, métastases osseuse). Malgré une efficacité clinique reconnue, de rares effets secondaires ont été rapportés suite à l'administration à long terme de ces molécules (ostéonécrose des maxillaires, fractures fémorales atypiques). De biodistribution tissulaire variable, ils se fixent préférentiellement dans les sites osseux à fort remodelage par leur tropisme calcique et présentent une affinité élevée pour la phase minérale. Cependant, le retentissement de cette interaction sur la composition et la qualité osseuse est encore mal connu. Après un état de l'art sur les connaissances actuelles relatives à l'impact des BPs sur la qualité osseuse, nous évaluerons, à partir d'une approche expérimentale, l'effet à court terme du zolédronate, administré à de fortes doses, sur la qualité osseuse mandibulaire de rat. Cette étude permet également d'apprécier les différences liées à l'âge tissulaire et au type histologique osseux.

JURY :

Président : Monsieur le Professeur Guillaume PENEL

Assesseurs : Monsieur le Docteur Yves BAILLEZ
Madame le Docteur Béatrice LOUVET
Madame le Docteur Cécile OLEJNIK

Membre invité : Madame le Docteur Marie-Anne ELSERMANS – COGNET