

50 376
1997
413

N° d'ordre : 2172

Université des Sciences et Technologies de Lille

Laboratoire de Chimie Biologique UMR 111 CNRS



CNRS

Thèse

présentée par

Stéphane LANDAIS

Pour l'obtention du grade de

Docteur de l'Université

Spécialité : BIOCHIMIE



Caractérisation biochimique et isolement des glycoprotéines de l'os bovin à partir d'une préparation industrielle : le complexe osséine-hydroxyapatite



INSTITUT DE RECHERCHE PIERRE FABRE

Soutenue le 17 décembre 1997 devant la commission d'examen

Président : Professeur André VERBERT

Rapporteurs : Docteur Henri COUSSE
Professeur Jean-Pierre BALI

Examineurs : Docteur Jean-Philippe COMBAL
Professeur Stéphane BOUQUELET
Docteur Jean-Claude MICHALSKI



D 030 177120 6

A mes parents
A la mémoire de mes beaux-parents

A Phanie

Ces travaux ont été réalisés dans le laboratoire de Chimie biologique de l'Université des Sciences et Technologies de Lille (Unité mixte de Recherche n° 111 du C.N.R.S., Directeur : Professeur André Verbert), sous la direction du Docteur Jean-Claude Michalski, Directeur de Recherche à l'I.N.S.E.R.M.

Ils ont fait l'objet d'un financement accordé par l'Institut de Recherches PIERRE FABRE.

Monsieur le Docteur Henri COUSSE,
je vous remercie avant tout d'avoir consenti à
nous confier l'étude de l'ONC, qui m'aura permis
de soutenir cette thèse. J'ajoute que c'est un
honneur singulier de vous compter parmi les membres
de ce jury et je remercie, en votre nom, les
Industries Pharmaceutiques PIERRE FABRE pour le
financement de cette étude.

Monsieur le Professeur Jean-Pierre BALI,
j'ai également l'honneur de vous compter parmi
les membres de ce jury et vous remercie d'avoir
accepté de juger ce travail.

Monsieur le Professeur André VERBERT,
je vous dois beaucoup pour la réalisation de
l'objectif que je m'étais fixé: soutenir une thèse
en Biochimie. Merci de m'avoir accueilli dans
votre laboratoire et je reste très honoré que
vous ayez accepté de juger ce travail.

Monsieur le Professeur Stéphane BOUQULET,
je suis heureux et honoré de votre présence parmi
les membres de ce jury et je vous en remercie sincèrement.

Monsieur le Docteur Jean-Philippe COMBAL,
cela fait un peu plus de deux années maintenant que
vous suivez la progression de ces travaux. Je tiens à
vous exprimer ma reconnaissance pour la confiance que
vous nous avez accordée et pour avoir accepté de
faire partie des membres de ce jury.

Monsieur le Docteur Jean-Claude MICHALSKI,
Je me souviens parfaitement de ce jour où j'ai fait
ta connaissance lors de la présentation des laboratoires
d'accueil du D.E.A. des Sciences de la Vie et de
la Santé. La discussion avait duré 2 heures et
c'est dès lors que tu m'as donné goût à la
recherche. Je te remercie très sincèrement de m'avoir
laissé saisir ma chance. Tu es pour beaucoup
dans la réussite de mes projets et je t'en suis
profondément reconnaissant. Merci encore de la confiance
que tu m'as accordée tout au long de ces 4 années,
merci de ta disponibilité, d'avoir été mon guide
scientifique et d'avoir tenu les promesses d'une thèse.
Cela ne s'oublie pas. Enfin, sache que c'est un honneur
d'avoir été ton élève et j'espère avoir contribué
en bien au développement de ton équipe.

Catherine ALONSO,
avant tout, je te remercie d'avoir défendu ma thèse
si ardemment, je sais de combien tu es responsable
de ce succès. Ce fut génial de partager ces heures de
labo à tes côtés. Mais surtout, merci d'être devenue
une amie.

Jean-Pierre ZANETTA, Calliope CAPON, Saïd TAHBOUB,
Tony LEFEBURE, Christine LADEN et Silvia ALTARE,
je vous remercie d'avoir contribué, chacun de votre
côté, à la réalisation de cette thèse. Merci du
coup de main !

Thierry GRARD, je te remercie de m'avoir permis
d'enseigner la Biochimie à tes côtés et j'avoue
m'être inspiré de tes talents de calligraphie
pour la rédaction de cette thèse.

Guillaume DUFLOS, tu as su m'apporter une aide morale appréciable qui m'aura indéniablement bien supporté. Je te souhaite, à ton tour, d'aller au bout de ta thèse. Bonne pêche...

Monsieur le Docteur Emmanuel PAES (j'ai pris un peu d'avance...), nous n'avons hélas jamais eu la possibilité de travailler ensemble, mais il me semble qu'au cours de ces dernières années nous avons partagé bien plus qu'une simple paille. Je te remercie d'avoir toujours répondu présent et d'être mon ami. Nous savons ce que cela représente...

Marie - Christine SLOPIANSKY, je te remercie pour toutes les suggestions de "protéiniste" dont tu m'as fait part, également pour ton sérieux et ta douceur perpétuels.

Merci pour tes compétences, quel bonheur !

Bernadette CORDEVILLE, je te suis extrêmement reconnaissant d'avoir passé tant de temps à la recherche bibliographique. Tu es d'une aide incontournable.

Monsieur le Professeur Hubert HONDERMARCK et Anne - Sophie VERCOUTTER, je vous remercie de l'aide que vous m'avez apportée lors de la réalisation des électrophorèses bidimensionnelles.

Je n'oublierai pas de remercier mes chers parents qui ont eu la patience d'attendre "quelques" années avant la clôture de mes études, et qui n'ont jamais cessé de m'apporter une aide morale bien venue.

Enfin, merci à toi Thanie pour tout ce que tu as pu m'offrir au cours de ces dernières années, et plus particulièrement depuis ces 6 derniers mois.

Ta générosité et ta patience ont été des atouts essentiels pour la réussite de cet ouvrage. Merci de m'avoir attendu. Cette thèse est aussi la tienne.

Merci à tous.

Stéphane

Sommaire

Abréviations	XIII
Index des figures	XV
Index des tableaux	XIX
INTRODUCTION	1
GENERALITES	
A. DESCRIPTION MORPHOLOGIQUE ET STRUCTURALE DE L'OS, COMPOSITION CHIMIQUE	2
B. LE REMODELAGE OSSEUX ET LES CELLULES OSSEUSES	6
B.I. LE PROCESSUS DE REMODELAGE OSSEUX	6
B.II. LES OSTEOCLASTES ET LA RESORPTION OSSEUSE	8
B.II.1. Morphologie et origine des ostéoclastes	8
B.II.2. La résorption ostéoclastique	10
a) Mécanisme général de la résorption	10
b) Contrôle de la résorption	16
B.III. LES OSTEOBLASTES ET LA FORMATION OSSEUSE	19
B.III.1. Morphologie et origine des ostéoblastes	19
B.III.2. La formation osseuse	23
a) Mécanisme général de la formation osseuse	23
b) Contrôle de la production de la matrice osseuse	26
c) Minéralisation de la matrice osseuse	29
C. LES PROTEINES DE LA MATRICE ORGANIQUE OSSEUSE	36
C.I. LES COLLAGENES	38
C.II. LES PROTEOGLYCANNES	44
C.II.1. Le biglycan et la décorine	44
C.II.2. Les autres protéoglycannes	46
C.III. LES γ -CARBOXYGLUTAMIQUE PROTEINES (GLA-PROTEINES)	47
C.III.1. L'ostéocalcine	48
C.III.2. La Gla Protéine matricielle (MGP)	54
C.III.3. La Protéine S	55
C.IV. LES PHOSPHO/SIALOPROTEINES	56
C.IV.1. La sialoprotéine osseuse (BSP)	57
C.IV.2. L'ostéopontine	62
C.IV.3. La Bone Acidic Glycoprotein 75 kDa (BAG-75)	66
C.IV.4. La sialoprotéine 59 et/ou 64 kDa (BSP-59/64) de rat	67
C.IV.5. L'ostéonectine (SPARC)	68
C.V. LES AUTRES PROTEINES A SEQUENCE RGD (ARG-GLY-ASP)	72
C.V.1. La thrombospondine	72
C.V.2. La fibronectine	72
C.V.3. La ténascine	73

C.VI. LES PROTEINES D'ORIGINE PLASMATIQUE	73
C.VI.1. L' α_2 HS glycoprotéine humaine	74
C.VI.2. La fétuine bovine	76
C.VII. CONCLUSION	78
D. LA GLYCOSYLATION DES PROTEINES	80
D.I. INTRODUCTION	80
D.II. LIAISONS DES CARBOHYDRATES AUX PEPTIDES	81
D.III. LES N-GLYCANNES	82
D.IV. LES O-GLYCANNES DE TYPE MUCINE	83
D.IV.1. Les noyaux O-glycanniques	84
D.IV.2. Le squelette des O-glycannes	85
D.IV.3. La périphérie des O-glycannes	85
D.V. CAS PARTICULIER DES GLYCOSAMINOGLYCANNES ET DES PROTEOGLYCANNES	86
D.VI. LES GLYCOSYL-PHOSPHATIDYLINOSITOL-PROTEINES (GPI- PROTEINE)	87
D.VII. CONCLUSION	89
PROCEDURES EXPERIMENTALES	
A. CARACTERISATION BIOCHIMIQUE DE LA PREPARATION INDUSTRIELLE OHC	90
A.I. ANALYSE PROTEIQUE	90
A.I.1. Méthode de dosage des protéines selon Lowry modifiée [302]	90
A.I.2. Profil électrophorétique sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE) des protéines de l'OHC	91
A.I.3. Electrophorèse bidimensionnelle sur gel de polyacrylamide (IEF, SDS-PAGE) des protéines non collagène de l'OHC	91
A.I.4. Méthode de dosage des acides aminés par chromatographie liquide haute performance (CLHP)	93
A.II. ANALYSE LIPIDIQUE	93
A.III. ANALYSE GLUCIDIQUE	94
A.IV. DOSAGE DES SULFATES	95
B. MISE AU POINT D'UN PROCEDE D'EXTRACTION DES PROTEINES DE L'OHC	95
C. ISOLEMENT ET CARACTERISATION D'UNE PROTEINE MAJEURE : L'ALPHA 2 HS GLYCOPROTEINE	97
C.I. CHROMATOGRAPHIE DE TAMISAGE MOLECULAIRE	98
C.II. CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE SUR COLONNE DE SEPHAROSE CL-6B PROCION RED HE-3B	98
C.III. CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE SUR COLONNE DE SEPHAROSE CL-6B CIBACRON BLUE F3-GA	98
C.IV. IMMUNOREVELATION A L'AIDE DES ANTICORPS POLYCLONAUX ANTI-SERUM ALBUMINE BOVINE, ANTI-FETUINE BOVINE ET ANTI- α_2 HS GLYCOPROTEINE HUMAINE	98
D. ISOLEMENT ET CARACTERISATION DES PROTEINES ACIDES : LES SIALO/ PHOSPHOPROTEINES	99
D.I. CHROMATOGRAPHIE D'ECHANGE D'ANIONS	99
D.II. CHROMATOGRAPHIE DE TAMISAGE MOLECULAIRE	101
D.III. CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE EN PHASE REVERSE (CLHP-PR)	101
D.IV. DIGESTION TRYPSIQUE EN GEL DE POLYACRYLAMIDE ET ANALYSE DES PEPTIDES FORMES PAR SPECTROMETRIE DE MASSE EN MODE MALDI-TOF [309]	101
D.V. SEQUENCAGE DES PROTEINES PAR DEGRADATION D'EDMAN	102

E. ETUDE DE LA STABILITE DE LA PREPARATION OHC EN FONCTION DU pH ET EN PRESENCE D'EXTRAITS GASTRIQUES ET DUODENaux HUMAINS - PREPARATION D'UN ANTICORPS POLYCLONAL ANTI-OHC (B)	102
E.I. PROFILS ELECTROPHORETIQUES DES HYDROLYSATS CHIMIQUES, GASTRIQUES ET DUODENaux	102
E.II. PREPARATION DE L'ANTICORPS POLYCLONAL ANTI-OHC (B)	103
E.III. REVELATION DES PROTEINES SPECIFIQUES DE L'OHC PAR L'ANTICORPS POLYCLONAL ANTI-OHC (B)	104
F. ETUDE DE LA GLYCOSYLATION DES PROTEINES DE LA MATRICE ORGANIQUE DE L'OS	105
F.I. UTILISATION DE LECTINES POUR L'IDENTIFICATION DES GLYCANNES PRESENTS A LA SURFACE DES GLYCOPROTEINES	105
F.II. METHODE CHIMIQUE D'ISOLEMENT DES GLYCANNES - CARACTERISATION DES STRUCTURES GLYCANNIQUES MAJEURES	105
F.II.1. Libération des O-glycannes	105
a) par β -élimination réductive	105
b) par hydrazynolyse [313]	106
F.II.2. Hydrolyse protéolytique par la Pronase E	107
F.II.3. Purification de la fraction neutre et des fractions acides	107
F.II.4. Analyse des monosaccharides par chromatographie en phase gazeuse (CPG)	108
F.II.5. Analyse des oligosaccharides par spectrométrie de masse (MALDI-TOF)	109
RESULTATS ET DISCUSSION	
A. CARACTERISATION BIOCHIMIQUE DE LA PREPARATION INDUSTRIELLE OHC	111
A.I. ANALYSE PROTEIQUE	111
A.I.1. Dosage des protéines selon Lowry modifiée [302]	111
A.I.2. Profil électrophorétique sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE) des protéines de l'OHC - Analyse comparative des profils de différents lots OHC	114
A.I.3. Electrophorèse bidimensionnelle de la fraction OHC (B) du lot OpFT 1172 L	117
A.I.4. Dosage des acides aminés par chromatographie liquide haute performance	119
A.II. ANALYSE LIPIDIQUE	120
A.III. ANALYSE GLUCIDIQUE	121
B. MISE AU POINT D'UN PROCEDE D'EXTRACTION DES PROTEINES DE L'OHC	123
C. ISOLEMENT ET CARACTERISATION D'UNE PROTEINE MAJEURE : L'ALPHA 2 HS GLYCOPROTEINE	127
D. ISOLEMENT ET CARACTERISATION DES PROTEINES ACIDES : LES SIALO/PHOSPHOPROTEINES	135
E. ETUDE DE LA GLYCOSYLATION DES PROTEINES DE LA MATRICE ORGANIQUE DE L'OS	139
E.I. UTILISATION DE LECTINES POUR L'IDENTIFICATION DES GLYCANNES PRESENTS A LA SURFACE DES GLYCOPROTEINES	139
E.II. COMPOSITION MOLAIRE EN MONOSACCHARIDES DE LA PREPARATION OHC	144
E.III. ETUDE DE LA GLYCOSYLATION DES PROTEINES TOTALES DE L'OHC	145
F. ETUDE DE LA STABILITE DE LA PREPARATION OHC EN FONCTION DU pH ET EN PRESENCE D'EXTRAITS GASTRIQUES ET DUODENaux HUMAINS - PREPARATION D'UN ANTICORPS POLYCLONAL ANTI-OHC (B)	148
CONCLUSION	154
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	156
ANNEXES	174

Abréviations

ADNc : Acide désoxyribonucléique complémentaire
 Ala : Alanine
 AMPc : Adénosine monophosphate 3'-5'cyclique
 Arg : Arginine
 ARNm : Acide ribonucléique messenger
 Asn : Asparagine
 Asp : Acide aspartique
 ATP : Adénosine triphosphate
 BAG-75 : *Bone acidic glycoprotein-75kDa*
 BGP : Gla-protéine osseuse
 BMP : *Bone morphogenic protein*
 BSP : Sialoprotéine osseuse
 CHAPS : 3-[(3-cholamidopropyl)diméthylammonio]-1-propane-sulfonate
 CLHP-PR : Chromatographie liquide haute performance en phase réverse
 CPG : Chromatographie phase gazeuse
 Cys : Cystéine
 DAB : 3,3'-diaminobenzidine-4,4'-tétrahydrochloride
 DAG : Diacyl glycérol
 DEAE : Diéthyl-amino-éthyl
 DTT : Dithithréitol
 EDTA : Ethylène diamine tétra-acétique
 EDTA-Na₂ : tétrasodium-éthylènediamine-tétra-acétate
 EGF : *Epidermal growth factor*
 FGF : *Fibroblast growth factor*
 Fuc : Fucose
 γ Glu : Acide γ-carboxyglutamique
 GAG : Glycosaminoglycane
 Gal : Galactose
 GalNAc : N-acétyl galactosamine
 Gla : Acide γ-carboxyglutamique
 Glc : Glucose
 GlcNAc : N-acétyl glucosamine
 GlcUA : Acide glucuronique
 Gln : Glutamine
 Glu : Acide glutamique
 Gly : Glycocolle
 His : Histidine
 Hyl : Hydroxylysine
 Hyp : Hydroxyproline
 IdoUA : Acide iduronique
 IFN : Interféron
 IGF : *Insulin-like growth factor*
 IL-1 : Interleukine-1
 Ile : Isoleucine
 IP3 : Inositol triphosphate
 kDa : kiloDalton
 Leu : Leucine
 LIF : *Leukemia inhibitor factor*
 Lys : Lysine
 M-CSF : *Colony stimulating factor M*
 Man : Mannose
 Met : Méthionine
 MGP : Gla-protéine matricielle
 MMP : *Matrix metallo-protease*
 NBT : 4-nitro blue tétrazolium chloride
 NeuAC : Acide N-acétyl neuraminique
 NeuGc : Acide N-glycolyl neuraminique
 OH-Lys : Hydroxy-lysine
 OH-Pro : Hydroxy-proline
 OHC : *Ossein hydroxyapatite complex*
 Osn : Ostéonectine
 PAGE : Electrophorèse en gel de polyacrylamide
 PBS : Tampon phosphate de sodium

PDGF : *Platelet-derived growth factor*
PG : Protéoglycane
PGE₂ : Prostaglandine E₂
Phe : Phénylalanine
PIP₂ : Phosphatidyl inositol diphosphate
PITC : Phénylisothiocyanate
PKC : Phosphokinase C
Pro : Proline
PrPTH : Peptide apparenté à la parathormone
PTH : Parathormone
PVP : Polyvinyl-pyrrolidone
R_{1,25(OH)₂D₃} : Récepteur de la 1,25-dihydroxyvitamine D₃
RGD : Asparaginy-Glycolyl-Aspartate
R_{IL-1} : Récepteur de l'interleukine 1
R_{PTH} : Récepteur de la parathormone
SAB : Sérum albumine bovine
SDS : Dodécyl-sulfate de sodium
Ser : Sérine
SPARC : *Acidic protein, secreted and rich in cystein*
TGF : *Transforming growth factor*
Thr : Thréonine
TNF : *Tumor necrosis factor*
Tyr : Tyrosine
Val : Valine
Xyl : Xylose

Index des figures

Figure 1 : Structure d'un os long (humérus).....	3
Figure 2 : Structure microscopique de l'os compact.....	4
Figure 3 : Différentes étapes du remodelage osseux.....	6
Figure 4 : Hypothèse de différenciation des ostéoclastes (selon Nijweide P.J. [10])	9
Figure 5-A : Groupe d'ostéoclastes creusant une lacune.....	11
Figure 5-B : Aspect ultrastructural d'un ostéoclaste dont la bordure plissée est en contact étroit avec la matrice osseuse.....	11
Figure 6 : Représentation schématique hypothétique des différents mouvements ioniques de l'ostéoclaste et mécanisme de la résorption.....	14
Figure 7 : Représentation schématique du mécanisme d'activation des ostéoclastes et sa régulation...	17
Figure 8 : Coupe histologique décrivant des ostéoclastes différenciés synthétisant du tissu osseux non minéralisé le long de l'os calcifié.....	20
Figure 9 : Origine et différenciation des ostéoblastes.....	22
Figure 10-A : Représentation schématique du processus de régulation par les facteurs hormonaux de la prolifération et de l'activité des ostéoblastes.....	27
Figure 10-B : Représentation schématique du processus de régulation par les facteurs locaux de la prolifération et de l'activité des ostéoblastes.....	28
Figure 10-C : Représentation schématique hypothétique du contrôle du processus de minéralisation de l'ostéoïde.....	34
Etapes clés de la minéralisation de l'ostéoïde	35
Figure 11 : Interventions potentielles des protéines osseuses non collagéniques dans la physiologie du squelette, et leur usage en tant que marqueurs.....	37
Figure 12 : Réactions d'hydroxylation de la proline en hydroxyproline et de la lysine en hydroxylysine..	39
Figure 13 : Structure et maturation du collagène de type I.....	40
Figure 14 : Oxydation d'un résidu de lysine en allysine.....	41
Figure 15 : Liaison de réticulation du collagène par condensation aldolique entre deux résidus d'allysine.....	42
Figure 16 : Le cycle de la vitamine K.....	48
Figure 17 : Structures primaires d'ostéocalcines d'espèces variées.....	49
Figure 18 : Biosynthèse et sécrétion de l'ostéocalcine par les ostéoblastes.....	51
Figure 19 : Concentrations plasmatiques de l'ostéocalcine de patients atteints de maladies osseuses et non osseuses.....	52
Figure 20 : Concentrations normales d'ostéocalcine plasmatique.....	53
Figure 21 : Modèle structural de la sialoprotéine osseuse (BSP).....	59
Figure 22 : Modèle structural de l'ostéopontine.....	62
Figure 23 : Modèle structural de l'ostéonectine.....	69
Rôles physiologiques hypothétiques des protéines osseuses	79
Figure 24 : Monosaccharides majeurs rencontrés dans les glycoprotéines. Structures et abréviations.....	81
Figure 25 : Type oligomannosidique.....	82
Figure 26 : Type complexe.....	82
Figure 27 : Type hybride.....	83
Figure 28 : Les noyaux O-glycanniques de type mucine (selon Schachter et Williams [296]).....	84
Figure 29 : Antigènes des groupes sanguins ABH et Lewis.....	85
Figure 30 : Substitutions rencontrées sur les chaînes terminales de type 1 et 2 des O-glycannes.....	86
Figure 31 : Les classes de glycosaminoglycannes.....	86
Figure 32 : Structure des glycosyl-phosphatidyl-inositol protéines.....	88
Figure 33 : Schéma de fractionnement des protéines de la matrice organique de l'os à partir du lot OHC OpFT 1172L.....	96
Figure 34 : Schéma de purification de l' α_2 HS glycoprotéine à partir de la fraction protéique (B) du lot OHC OpFT 1172L.....	97

Figure 35 : Schéma de purification des protéines acides majeures à partir de la fraction protéique (B) du lot OHC OpFT 1172L.....	100
Figure 36 : Schéma de fractionnement et d'analyse des glycanes des glycoprotéines non collagène de l'OHC OpFT 1172L (B).....	109
Figure 37 : Comparaison de la méthode de dosage à 125°C pendant 5 minutes avec la référence établie par Lowry à 100°C pendant 10 minutes.....	112
Figure 38 : Etude comparative des temps d'incubation de l'OHC à 100°C selon la méthode de dosage modifiée décrite par Lowry.....	112
Figure 39 : Etude comparative des temps d'incubation de l'OHC à 125°C selon la méthode de dosage modifiée décrite par Lowry.....	113
Figure 40 : Profils de migration électrophorétique en gel de polyacrylamide (SDS-PAGE 4-20%) des lots OHC d'origines géographiques diverses.....	116
Figure 41-A : Profil de migration électrophorétique (SDS-PAGE 10%) après isoélectrofocalisation de la fraction OpFT 1172L (B) préalablement digérée par la chondroïtinase ABC.....	117
Figure 41-B : Représentation schématique du profil de migration électrophorétique (SDS-PAGE 10%) de la fraction OHC OpFT 1172L (B) après isoélectrofocalisation.....	118
Figure 42-A : Chromatographie sur couche mince (Silica gel 60) des fractions glycolipidiques isolées à partir de moelle osseuse bovine.....	120
Figure 42-B : Etude en spectrométrie de masse de type MALDI-TOF du composé isolé de la phase chloroformique inférieure par chromatographie préparative sur silice.....	122
Figure 42-C : Structure du ganglioside Gg3 (C24).....	121
Figure 43 : Profils de migration électrophorétique en conditions réductrices et non réductrices du lot OHC OpFT 1172L et des fractions obtenues par déminéralisation.....	123
Figure 44 : Profil de migration électrophorétique (SDS-PAGE) des protéines non collagène isolées d'espèces différentes (selon Fisher [316]).....	125
Figure 45 : Profil de migration électrophorétique en gel de polyacrylamide (SDS-PAGE) des différentes fractions obtenues par tamisage moléculaire (Sephacrose CL-6B) à partir des protéines non collagène OHC OpFT 1045L (B).....	127
Figure 46 : Tamisage moléculaire (Sephacrose CL-6B) de la fraction, protéique non collagène OHC OpFT 1045L (B).....	128
Figure 47 : Profil de migration électrophorétique en gel de polyacrylamide (SDS-PAGE) des fractions non retenue (1) et retenues (2 et 3) obtenues par chromatographie d'affinité sur colonne de Procion red.....	128
Figure 48 : Chromatographie d'affinité (Procion red HE-3B) des fractions d'intérêt isolées par tamisage moléculaire des protéines OHC OpFT 1045L (B).....	129
Figure 49 : Profil de migration électrophorétique en gel de polyacrylamide (SDS-PAGE) des fractions obtenues par chromatographie d'affinité (Cibacron blue F3-GA) à partir de la fraction non retenue sur Procion red.....	129
Figure 50 : Chromatographie d'affinité (Cibacron blue F3-GA) de la fraction retenue sur colonne de Procion red.....	130
Figure 51 : Immunorévélation par l'anticorps anti-SAB des fractions retenues par chromatographie d'affinité.....	131
Figure 52 : Immunorévélation par l'anticorps anti-fétuine bovine des fractions retenues par chromatographie d'affinité.....	131
Figure 53 : Immunorévélation par l'anticorps anti- α_2 HS glycoprotéine humaine des fractions obtenues par déminéralisation.....	132
Figure 54 : Immunorévélation par l'anticorps anti- α_2 HS glycoprotéine primaire des fractions obtenues par chromatographie d'affinité.....	133
Figure 55 : Immunorévélation par l'anticorps anti-sérum de chèvre primaire des fractions obtenues par chromatographie d'affinité.....	133
Figure 56 : Profil de migration électrophorétique (SDS-PAGE) des fractions non retenues sur DEAE A ₅₀ (1) et des fractions retenues 200mM NaCl (2) et 300mM NaCl (3).....	135
Figure 57 : Profil de migration électrophorétique (SDS-PAGE) des fractions acides (retenues sur DEAE A ₂₅) isolées par tamisage moléculaire (colonne S-100).....	135
Figure 58 : Tamisage moléculaire (Sephacryl S-100) de la fraction protéique fortement retenue sur colonne d'échange d'anions.....	136
Figure 59 : Profil d'éluion CLHP en phase réverse sur colonne C8 de la fraction acide précédemment isolée par tamisage moléculaire (Sephacryl S-100, pic 2)	137

Figure 60 : Profils de migration électrophorétique (SDS-PAGE 10%) des fractions isolées par CLHP en phase réverse sur colonne C_8 , à partir du pic 2 obtenu par tamisage moléculaire (S-100)....	136
Séquence primaire de la PLK bovine	138
Figure 61 : Révélation par la lectine <i>Galanthus nivalis agglutinin</i> du lot OpFT 1172L et des fractions obtenues par déminéralisation.....	140
Figure 62 : Structures des oligosaccharides majeurs O-liés à la sialoprotéine osseuse (BSP) ; selon Midura [160].....	141
Figure 63 : Révélation par la lectine <i>Sambuccus nigra agglutinin</i> du lot OpFT 1172L et des fractions obtenues par déminéralisation.....	141
Figure 64-A : Structures oligosaccharidiques majeures N- et O-liées à la fétuine bovine [271].....	142
Figure 64-B : Structures oligosaccharidiques majeures N- et O-liées aux chaînes A (2 de type N et 2 de type O) et B (1 de type O) de l' α_2 HS glycoprotéine [271].....	142
Figure 65 : Révélation par la lectine <i>Maackia amurensis agglutinin</i> du lot OpFT 1172L et des fractions obtenues par déminéralisation.....	143
Figure 66 : Révélation par la lectine <i>Peanut agglutinin</i> du lot OpFT 1172L et des fractions obtenues par déminéralisation.....	143
Figure 67 : Chromatographie sur couche mince de silice des glycanes libérés par hydrolyses chimiques de la fraction OHC OpFT 1172L (B).....	145
Figure 68 : Chromatographie sur couche mince de silice des N-glycosyl-peptides et oligosaccharides alditols libérés par b-élimination et fractionnés par tamisage moléculaire sur Bio-Gel P4...	146
Figure 69 : Profils de migration électrophorétique de l'OHC OpFT 1130L après incubation 1, 2 et 4 heures à 37°C en présence de différentes solutions tamponnées à pH1, 2, 4 et 7.....	148
Figure 70-A : Chromatographie en phase gazeuse de la fraction OHC OpFT 1045L (B).....	150
Figure 70-B : Chromatographie en phase gazeuse de la fraction OHC OpFT 1045L (B) après dessalage sur Bio-Gel P2 (acide acétique 1%).....	150
Figure 71 : Profils de migration électrophorétique du lot OHC OpFT 1130L après incubation en présence d'extraits gastriques et duodénaux humains.....	151
Figure 72 : Immunorévélation par l'anticorps polyclonal anti-OHC (B) des fractions OpFT 1130L incubées en présence d'extraits gastriques et duodénaux humains.....	151
Figure 73 : Immunorévélation par l'anticorps polyclonal anti-OHC (B) de lots OHC d'origines géographiques diverses.....	152

Index des tableaux

Tableau 1 : Renouvellement du tissu osseux.....	7
Tableau 2 : Effets des principaux facteurs hormonaux et locaux sur les tissus osseux.....	29
Tableau 3 : Distribution des protéines majeures retrouvées dans le tissu osseux.....	38
Tableau 4 : Résidus d'acides aminés/1000 des sialoprotéines osseuses (BSP) isolées d'espèces différentes.....	58
Tableau 5 : Comparaison des structures des sialoprotéines osseuse de différentes espèces.....	61
Tableau 6 : Comparaison structurale de l'ostéopontine et de la sialoprotéine osseuse.....	66
Tableau 7 : Comparaison des sialoprotéines 59 et 64kDa de rat avec l' α_2 HS glycoprotéine humaine.....	67
Tableau 8 : Rôles majeurs des glycannes des glycoprotéines.....	89
Tableau 9 : Absorbances moyennes et écart-types obtenus pour des concentrations variables en OHC.	113
Tableau 10 : Absorbances moyennes, concentrations en protéines et pourcentage de protéines des différentes concentrations en OHC.....	114
Tableau 11 : Spécificité de réaction de différentes lectines végétales.....	140

Introduction

Le tissu osseux est formé d'une matrice extracellulaire calcifiée abondante. Il a un rôle primordial de maintien de l'homéostasie minérale des liquides extracellulaires et aussi un rôle de soutien et de protection des autres tissus de l'organisme. Le métabolisme osseux correspond à un système complexe, unique dans l'organisme, où deux familles de cellules s'opposent lors des processus de formation et de résorption osseuses.

On définit donc un cycle de remodelage osseux au cours duquel les ostéoclastes résorbent initialement la matrice organique et minérale âgée, ce qui entraîne la formation d'une lacune. Les ostéoblastes ont alors la charge de synthétiser une nouvelle matrice organique osseuse au sein de cette lacune qui sera, par un mécanisme non encore élucidé, minéralisée. Le complexe phosphocalcique/matrice organique formé constitue la structure rigide du squelette.

Ainsi, on distingue dans le tissu osseux la matrice minérale phosphocalcique de la matrice organique protéique.

L'essentiel de nos travaux a consisté en l'analyse et la caractérisation biochimique d'une préparation industrielle de fémur bovin « Ossein Hydroxyapatite Complex » fournie par les industries pharmaceutiques PIERRE FABRE MEDICAMENTS et obtenue par broyage puis extraction à l'acétone, et en l'isolement et la caractérisation biochimique des familles protéiques et glycoprotéiques majeures de la matrice organique.

Nous ferons précéder l'exposé de nos travaux par une revue sur le métabolisme osseux et sa régulation. Après la description des principales protéines et glycoprotéines présentes dans la matrice organique de l'os, un chapitre fera le point sur nos connaissances actuelles de la structure primaire des chaînes glycaniques des glycoprotéines.

Généralités

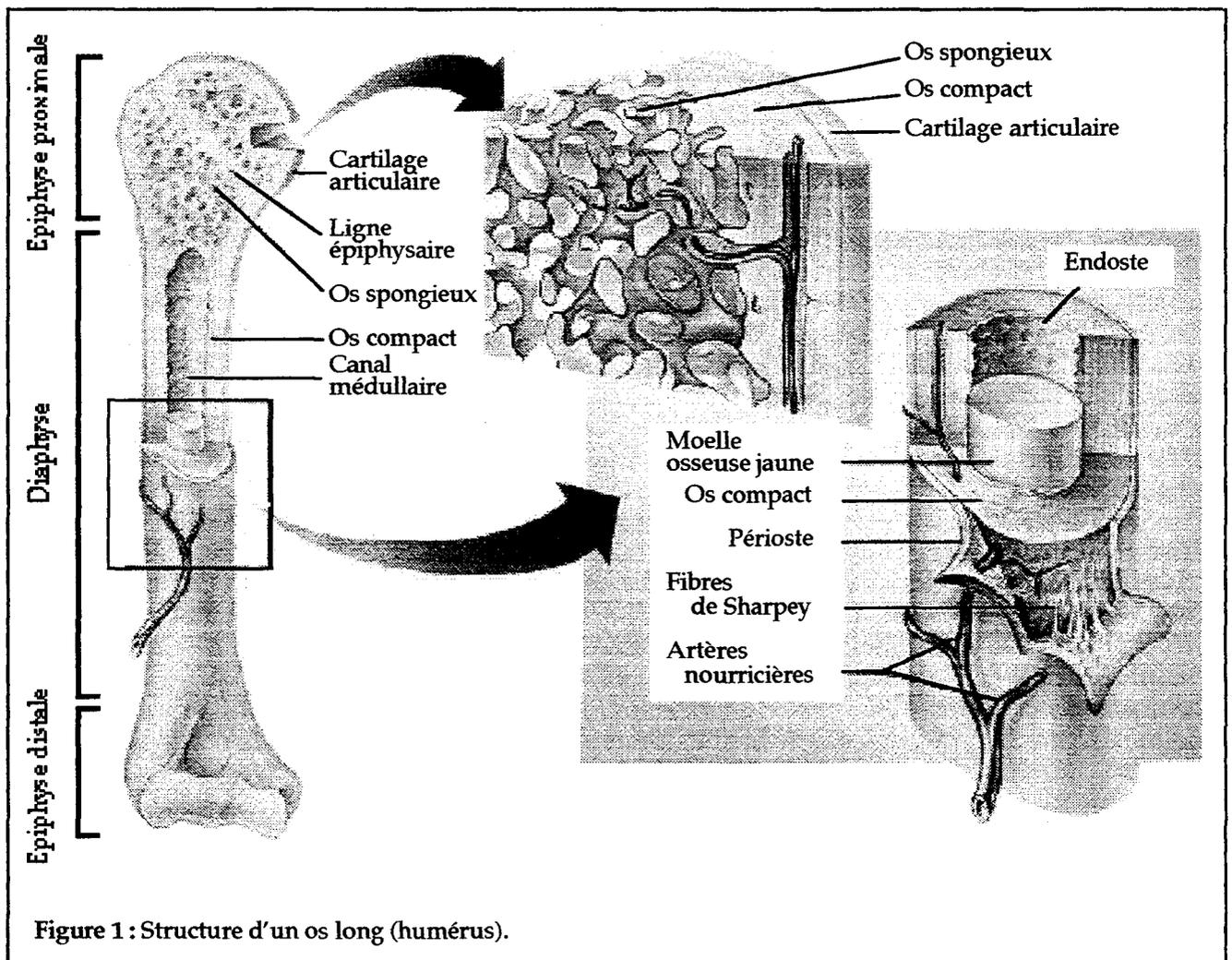
A. DESCRIPTION MORPHOLOGIQUE ET STRUCTURALE DE L'OS, COMPOSITION CHIMIQUE

Les os constituent une structure rigide qui sert de support d'ancrage à tous les organes mous de notre corps. En cela ils jouent un rôle basique de soutien et de protection. Parallèlement, le tissu osseux est formé d'une matrice extracellulaire abondante qui a la particularité d'être calcifiée et qui permet le maintien primordial de l'homéostasie minérale des liquides extracellulaires. La matrice osseuse constitue donc un réservoir de minéraux, dont les principaux sont le calcium et le phosphore, mais on y trouve également du sodium, du soufre, du magnésium et du cuivre. Au besoin, ces minéraux peuvent être mobilisés et libérés dans la circulation sanguine sous forme d'ions, puis distribués dans l'organisme. L'os correspond donc à un tissu vascularisé composé d'un compartiment cellulaire et d'un compartiment extracellulaire qui prédomine en terme de volume.

Du point de vue anatomique, les os sont classés selon leur forme mais tous les os sont constitués de deux principaux types de tissu osseux : l'os compact ou cortical qui est dense, lisse et homogène, et l'os spongieux ou trabéculaire constitué de petites pièces pointues ou plates appelées travées formant un réseau dont les cavités contiennent la moelle. On distingue donc : 1) les os longs formés essentiellement d'os compact et à partir desquels notre travail de recherche a été effectué (fémur), si bien que seule l'anatomie des os longs sera décrite ; 2) les os courts, plus ou moins cubiques, formés essentiellement d'os spongieux (poignet, cheville) ; 3) les os plats, minces, présentant deux faces d'os compact séparées par une fine couche d'os spongieux (sternum, côtes) ; 4) les os irréguliers n'entrant pas dans les précédentes catégories, constitués essentiellement d'os spongieux recouvert de fines couches d'os compact (vertèbres et certains os du crâne).

Ainsi, l'anatomie macroscopique d'un os long typique a une structure générale constituée de 6 parties qui sont: 1) la diaphyse, appelée également le corps osseux. Elle est de forme tubulaire et constitue l'axe longitudinal de l'os long (**figure 1 p.3**). Elle consiste en un

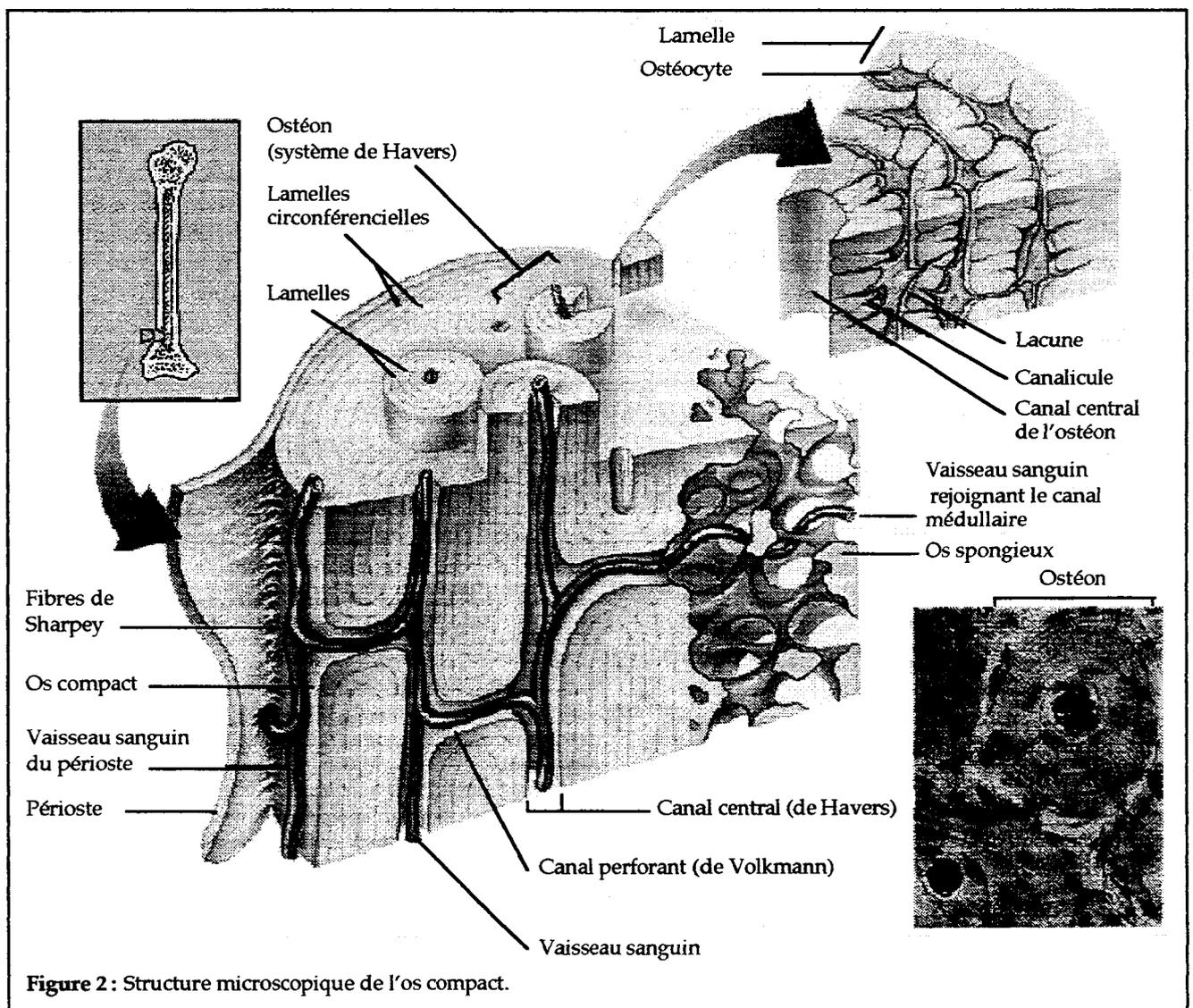
cylindre épais renfermant un canal médullaire ou une cavité médullaire ; 2) les épiphyses correspondant aux extrémités de l'os ; 3) la ligne épiphysaire constituant le reliquat de cartilage de conjugaison qui se trouve à la jonction de l'épiphysaire et de la diaphyse dans les os jeunes ; 4) le périoste constituant une membrane double recouvrant la surface externe



de la diaphyse. Cette double membrane correspond à une première couche fibreuse composée de tissu conjonctif dense et à une seconde couche interne (ostéogène, site de remodelage et de résorption osseux) qui repose sur la surface osseuse, comportant surtout des ostéoblastes et des ostéoclastes. Le périoste constitue également les points d'insertion ou d'ancrage des tendons et des ligaments ; 5) l'endoste, fine membrane de tissu conjonctif, garnissant les surfaces internes de l'os et s'intercalant entre le canal médullaire et l'os compact. Tout comme le périoste, l'endoste contient à la fois des ostéoblastes et des ostéoclastes ; 6) le cartilage articulaire recouvrant la partie osseuse de l'épiphysaire par

laquelle les os longs s'articulent. Ce cartilage amortit la pression pendant les mouvements d'articulation.

La structure microscopique des os différencie l'os compact ou cortical de l'os spongieux trabéculaire. Ainsi, l'os compact est constitué d'une unité structurale appelée ostéon ou système de Havers, qui a la forme d'un cylindre allongé et orienté selon l'axe longitudinal de l'os. L'ostéon correspond en fait à un ensemble de cylindres creux composés de matrice osseuse et placés les uns dans les autres (os lamellaire ; **figure 2**). Le centre de chaque ostéon forme un canal central (canal de Havers) où passent de petits vaisseaux sanguins et des neurofibres desservant les cellules de l'ostéon.



Contrairement à l'os compact, l'os spongieux semble être un tissu peu structuré. Il est constitué de travées qui, en fait, sont loin d'être placées de façon aléatoire puisque

l'analyse de la situation précise de ces travées reflète les contraintes subies par l'os et lui permet d'y résister au mieux. Ces travées ouvertes sur la moelle hématopoïétique comportent des lamelles irrégulières et des ostéocytes reliés entre eux par des canalicules.

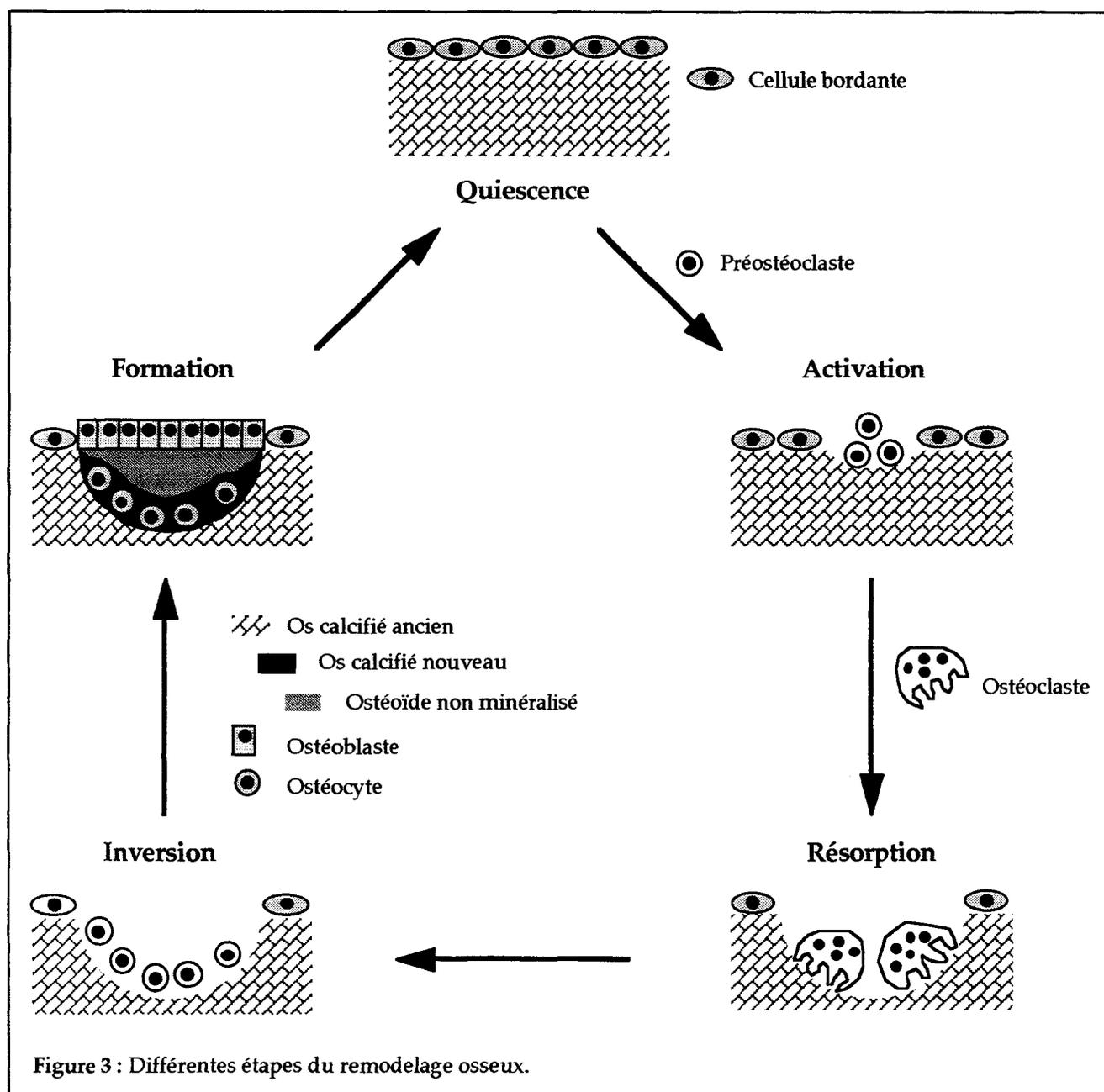
La composition chimique de l'os comprend d'une part les constituants organiques des cellules et de l'ostéoïde, et, d'autre part les constituants inorganiques de la matrice osseuse ou hydroxyapatites. L'ostéoïde correspond à la partie organique de la matrice osseuse et représente approximativement 20% de la matrice osseuse. On y retrouve du collagène, des protéoglycannes et des glycoprotéines qui font l'objet de ce travail. Les hydroxyapatites sont des sels minéraux phosphocalciques arrangés en cristaux situés entre et autour des fibres de collagènes et qui confèrent à l'os sa dureté.

Enfin, le tissu osseux a la particularité unique de se renouveler dans des sites distincts grâce à l'action séquentielle et opposée de deux types cellulaires : les ostéoblastes et les ostéoclastes. Ce processus est hautement régulé au niveau local, et permet le renouvellement de la matrice extracellulaire et le maintien de la masse osseuse au cours de la vie adulte.

B. LE REMODELAGE OSSEUX ET LES CELLULES OSSEUSES

B.I. LE PROCESSUS DE REMODELAGE OSSEUX

Au sein de chacune des unités de remodelage corticale ou trabéculaire se succèdent les différentes phases du remodelage osseux (**figure 3**) : tout d'abord, le long de la surface osseuse inactive, recouverte de cellules bordantes, apparaissent les précurseurs cellulaires



mononucléés des ostéoclastes. C'est la phase d'activation qui correspond à la différenciation ostéoclastique. Cette phase d'activation est suivie par la phase de résorption dès que les ostéoclastes dégradent l'os ancien. On observe alors la formation

d'une lacune où les ostéoclastes sont remplacés par des cellules mononucléées de type macrophagique. Ce phénomène de couplage entre les différents types cellulaires nécessite qu'un « signal » soit donné à la fin de la phase de résorption pour que survienne le recrutement des ostéoblastes qui combleront la lacune : c'est la phase d'inversion. Lors de la phase de reconstruction ou de formation, les ostéoblastes apparaissent alors dans la lacune et la combleront en apposant dans un premier temps une nouvelle matrice osseuse non minéralisée, appelée ostéoïde, qui se minéralise par la suite. La durée totale de ce cycle de remodelage est d'environ 150 jours dans l'os adulte. Les unités de remodelage effectuent leur cycle les unes après les autres, si bien que le phénomène n'est pas synchrone dans le squelette [1]. Toutefois, il existe un équilibre dans le maintien de l'architecture et de la masse osseuse, tant et si bien que les activités de formation et de résorption osseuses sont quantitativement identiques.

Le remodelage osseux fait donc intervenir les deux types de cellules osseuses ostéoclastes et ostéoblastes, les ostéocytes correspondant à des ostéoblastes enfouis dans la matrice osseuse néo-synthétisée. Ce processus est hautement régulé et nécessite des interactions, d'une part entre les deux types cellulaires osseux, et, d'autre part entre ces cellules osseuses et la matrice qu'elles ont synthétisée.

Le nombre d'unités fonctionnelles et la vitesse de renouvellement de l'os cortical et trabéculaire sont différents. Il apparaît que le nombre d'unités de remodelage par unités

	Os cortical	Os spongieux	de volume est de 20
Nombre d'unités de remodelage :			fois moins élevé dans
- par m ³ de tissu osseux	0,2	4,0	
- dans le squelette	0,3·10 ⁶	1,4·10 ⁶	l'os cortical que dans
Nombre d'unités de remodelage activées par heure	100	760	l'os spongieux. En fait,
Renouvellement global (%/an)	3 à 4	25	la taille des unités de

Tableau 1 : Renouvellement du tissu osseux remodelage dans l'os

cortical est bien supérieure à celle de l'os spongieux (tableau 1). De même, la fréquence d'activation des unités de remodelage dans le tissu spongieux est bien supérieure à celle

de l'os cortical, probablement en raison de la grande surface de contact entre l'os et la moelle hématopoïétique de l'os spongieux, et en raison de la différenciation des cellules osseuses à partir du tissu hématopoïétique ou stromal de la moelle.

Globalement le renouvellement de l'os spongieux est donc 5 à 8 fois plus rapide que celui de l'os cortical. Un déséquilibre dans la séquence du remodelage aura des répercussions plus précoces sur l'architecture osseuse et d'intensité plus importante dans l'os spongieux que dans l'os cortical [2].

La fonction du processus physiologique de remodelage est donc double : renouveler les structures osseuses anciennes et contribuer à l'équilibre minéral phosphocalcique de l'organisme.

B.II. LES OSTEOCLASTES ET LA RESORPTION OSSEUSE

B.II.1. Morphologie et origine des ostéoclastes

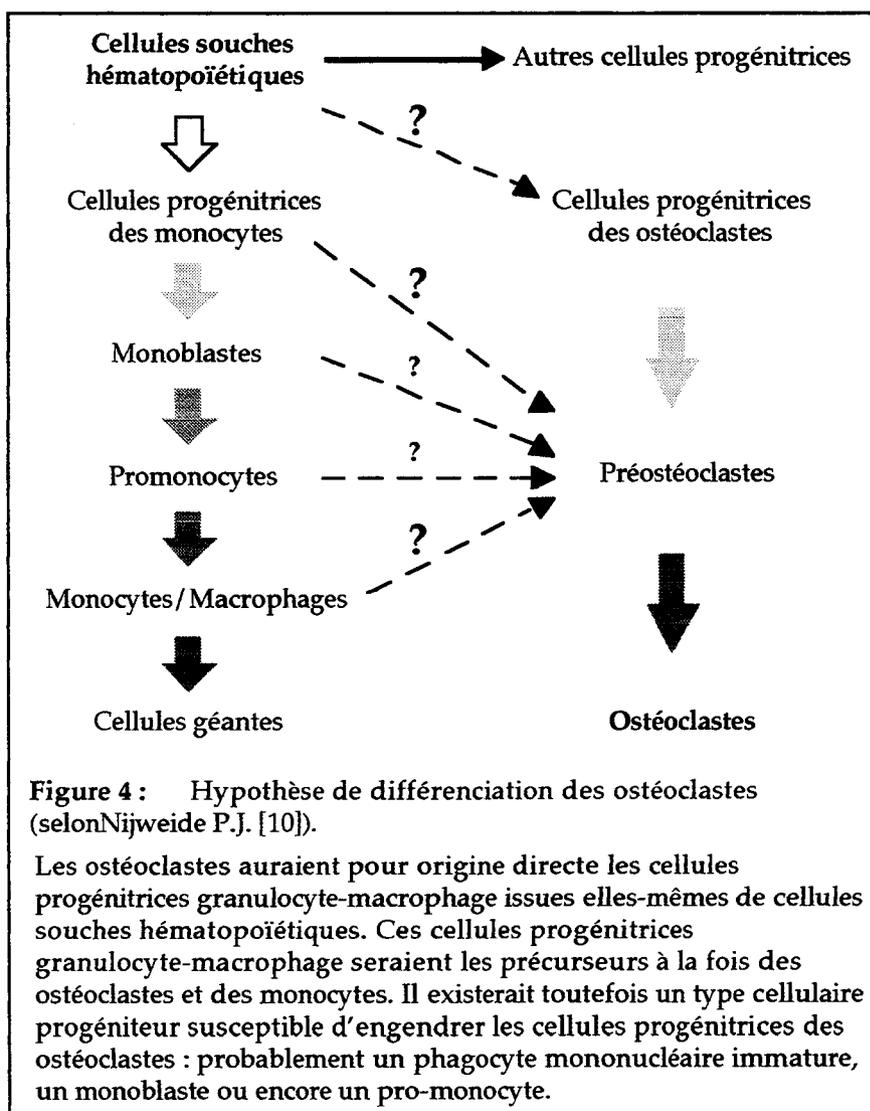
L'ostéoclaste est une cellule géante multinucléée possédant une morphologie caractéristique qui la distingue de l'ensemble des cellules présentes dans le tissu osseux [3, 4]. Ainsi, le cytoplasme de ces cellules est riche en mitochondries et en lysosomes, mais il est peu abondant en réticulum endoplasmique [5]. Les ostéoclastes ont donc une forte capacité à produire de l'énergie et une activité catabolique enzymatique aiguë. La morphologie multi-nucléaire des ostéoclastes n'est pas le résultat de mitoses. Ces cellules proviendraient donc de la fusion de précurseurs cellulaires suffisamment matures pour être fonctionnels [6].

Dans l'os adulte, la différenciation ostéoclastique nécessite différentes étapes survenant le long de la surface osseuse : 1) la prolifération de précurseurs mononucléés dans la moelle hématopoïétique ; 2) la fusion de ces précurseurs par l'intermédiaire d'une molécule de liaison intercellulaire, la cadhérine E [7] ; 3) l'acquisition des critères du phénotype ostéoclastique par des précurseurs multinucléés ; 4) enfin, la polarisation de la cellule correspondant à la liaison sur l'os par la « zone claire » et l'acquisition de la fonction de résorption.

Les travaux sur l'ostéopétrose animale et humaine ont permis de démontrer l'origine hématopoïétique de l'ostéoclaste. L'ostéopétrose est une affection héréditaire rare, caractérisée par une ostéosclérose diffuse due à une totale absence d'ostéoclastes ou à une incapacité des ostéoclastes à résorber le tissu osseux. Or, par transplantation de cellules hématopoïétiques saines, des souris ostéopérotiques irradiées peuvent être guéries [8].

Etant donné les similarités fonctionnelles de dégradation entre les ostéoclastes et les macrophages, le débat sur l'origine de l'ostéoclaste au sein des cellules hématopoïétiques s'est focalisé sur les relations entre les précurseurs ostéoclastiques et la lignée monocytaire/macrophagique. En dehors du fait qu'il est admis que les précurseurs des ostéoclastes sont différents des ostéoblastes, les travaux menés *in vitro* pour démontrer que l'ostéoclaste et le macrophage ont ou n'ont pas de précurseurs communs, sont controversés [9, 10, 11]. On

admet globalement que les ostéoclastes sont dérivés de cellules mononucléaires ayant pour origine la moelle osseuse ou d'autres organes hématopoïétiques, et que ces cellules migrent vers le tissu osseux via la circulation vasculaire. La nature précise des cellules souches des cellules ostéoclastiques et pré-ostéoclastiques n'est pas encore établie. Toutefois, on suppose que le stade initial de



différenciation est commun à celui des monocytes/ macrophages, mais que la différenciation finale divergerait de celle des monocytes (figure 4 p.9) [12].

La formation des ostéoclastes correspond donc à un processus en plusieurs étapes incluant la prolifération, la différenciation puis la fusion cellulaire. C'est la raison pour laquelle on distingue plusieurs stades cellulaires différant par leur stade de différenciation [10] : 1) les cellules progénitrices des ostéoclastes, sans caractéristique particulière, assurant la prolifération cellulaire ; 2) les cellules précurseurs des ostéoclastes évoluant du stade phosphatase acide tartrate-non résistant au stade tartrate-résistant ; 3) les ostéoclastes correspondant à la fusion de cellules précurseurs entre elles ou avec un ostéoclaste ; 4) les cellules post-ostéoclastes résultant de la fission des ostéoclastes en cellules mononucléaires.

Différents agents interviendraient au cours de ces étapes de différenciation des ostéoclastes. Il semble que les contacts intercellulaires soient essentiels entre ostéoclastes et ostéoblastes : des facteurs spécifiques solubles synthétisés par les ostéoblastes et/ou les cellules stromales seraient impliqués dans la différenciation ostéoclastique, et, par la suite, dans la cascade d'événements nécessaires à la résorption [13]. D'autre part, certaines protéines de la matrice calcifiée, comme l'ostéocalcine, le collagène de type I ou le TGF β , se comportent, *in vitro*, comme des facteurs chimiotactiques pour les précurseurs des ostéoclastes. Ces protéines pourraient donc influencer la migration des précurseurs des ostéoclastes de la moelle vers la surface osseuse. Ainsi, la différenciation des ostéoclastes nécessite de nombreuses interactions de type cellule-cellule ou cellule-matrice, mais à l'heure actuelle la chronologie de ces interactions au cours de la différenciation ostéoclastique fait toujours l'objet de nombreuses controverses.

B.II.2. La résorption ostéoclastique

a) Mécanisme général de la résorption

L'ostéoclaste est la cellule en charge de la résorption osseuse, mais il n'est pas certain que d'autres cellules, comme les macrophages [14] ou certaines cellules cancéreuses

[15, 16] capables de résorption des particules osseuses *in vitro*, puissent résorber l'os *in vivo*. C'est l'anatomiste Albert Kölliker qui, en 1873, fut le premier à proposer que les cellules multinucléées observées sur certaines surfaces de l'os étaient responsables du phénomène de résorption osseuse [17].

L'ostéoclaste est le plus souvent accolé à la surface osseuse au niveau d'une dépression appelée lacune de Howship résultant de son activité de résorption (figure 5-A). La portion centrale de contact avec la matrice correspond à des protusions cytoplasmiques d'un

« bord plissé » (figure 5-B). Cette aire

est entourée d'une « zone claire »

(zone périphérique du cytoplasme

dépourvue de tout organelle autre

que les microfilaments du

cytosquelette) qui, par de fortes

liaisons entre ostéoclastes et matrice

osseuse, isole et délimite une aire

centrale de résorption [13, 18, 19]. A

ce point de contact cellule-matrice

osseuse, la membrane plasmique

contient de nombreuses protusions

organisées en rangs et appelées

podosomes [20, 21]. Le mécanisme de

liaison n'est pas clairement établi ;

toutefois la présence de récepteurs à

vitronectine à la surface

membranaire des ostéoclastes

pourrait être à l'origine de ces fortes

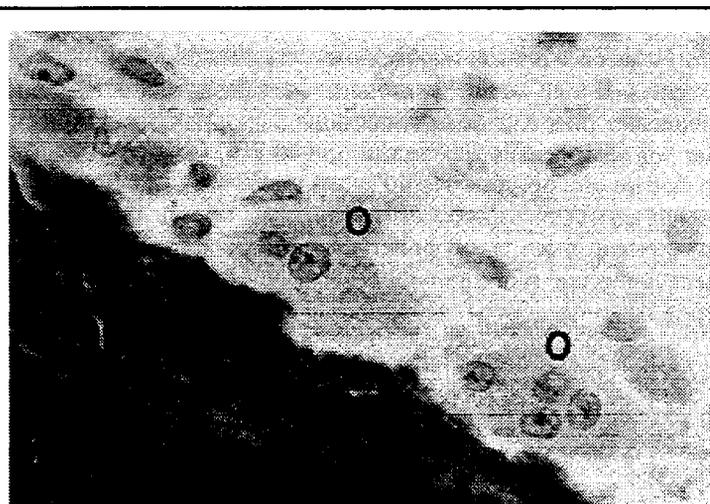


Figure 5-A : Groupe d'ostéoclastes (O) creusant une lacune (x100).

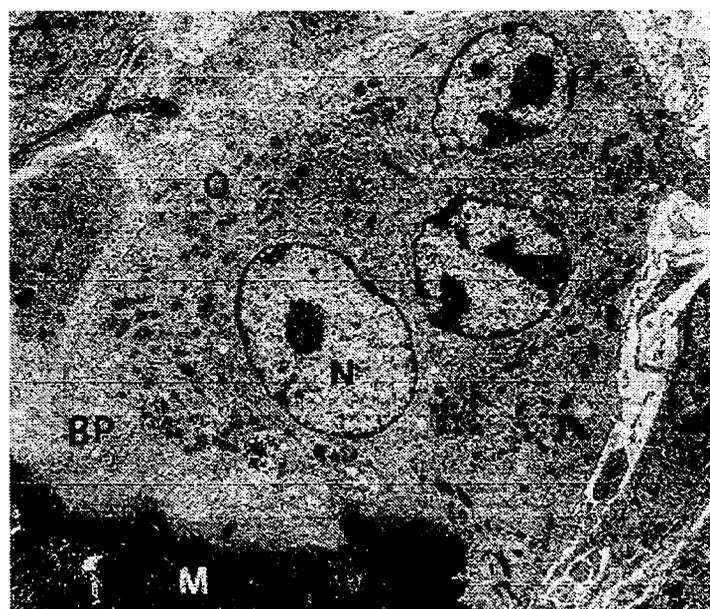


Figure 5-B : Aspect ultrastructural d'un ostéoclaste (O) (noyau : N) dont la bordure plissée (BP) est en contact étroit avec la matrice osseuse (M) (x10000).

interactions [13, 21, 22, 23]. Le récepteur à vitronectine est un hétérodimère formé de sous-unités liées de façon non covalentes de type $\alpha_v\beta_3$ appartenant à la famille des intégrines. Il interagirait avec des protéines d'adhésion via une séquence tripeptidique RGD. Parmi les protéines retrouvées dans la matrice osseuse, seules l'ostéopontine, la sialoprotéine osseuse, la vitronectine et la fibronectine interagissent avec la sous-unité β_3 de ce récepteur de type intégrine localisé à la surface des podosomes des ostéoclastes. La thrombospondine et la ténascine, qui possèdent des séquences RGD fonctionnelles, ne présentent pas d'affinité pour ce type de récepteur [24, 25]. D'autre part, des études d'immunolocalisation ont montré qu'à ce jour, seule l'ostéopontine était localisée à la surface osseuse [26] et qu'il existerait une co-localisation de l'ostéopontine et du récepteur dans la « zone claire ». On suppose que, suite à son accumulation le long de la surface de l'os, l'ostéopontine se lie aux ostéoclastes ou à leurs précurseurs. Il en résulterait une attache rigide qui permettrait localement (dans la bordure plissée) une résorption active de l'os [13]. Par ailleurs, les ostéoclastes adhèrent et s'étalent sur l'ostéocalcine (qui est une protéine ne contenant pas la séquence RGD). *In vitro*, le contact de l'ostéoclaste avec cette protéine induit la sécrétion d'ostéopontine, et des modifications de la concentration en calcium intracellulaire [27]. Les intégrines de type $\alpha_2\beta_1$ sont également connues pour agir comme des récepteurs ostéoclastiques du collagène de type I, et leur présence à la surface des ostéoclastes, dans la bordure plissée, serait essentielle au processus de résorption [28]. Les phosphatases acides tartrate-résistantes caractéristiques des ostéoclastes déphosphorylent les protéines sur lesquelles les ostéoclastes adhèrent, à savoir l'ostéopontine et la sialoprotéine osseuse (BSP). Or, leur capacité de liaison aux ostéoclastes diminue de façon significative lorsqu'elles sont déphosphorylées. La sécrétion de cette phosphatase acide dans l'aire de résorption pourrait donc réguler la liaison des ostéoclastes à la matrice osseuse [29]. Enfin, la métalloprotéase 9 MMP-9 (collagénase de type IV/gélatinase B, capable de la dégradation des chaînes α_2 des collagènes I, III et V) a

été localisée exclusivement dans les ostéoclastes humains. Cette métalloprotéase 9 ainsi que la MMP-1 (collagénase interstitielle) et probablement la MMP-2 (collagénase de type IV/gélatinase A) [30] pourraient dégrader les collagènes du micro-environnement ostéoclastique [31].

Les connaissances concernant les mécanismes de la résorption ostéoclastique ont considérablement évolué au cours de ces dernières années, notamment grâce à la mise au point de techniques d'isolement et de mise en culture des ostéoclastes à partir d'os de poulets [32], de rats ou de lapins [33]. On admet donc que la zone active de résorption est confinée à proximité de la surface osseuse où la structure membranaire de l'ostéoclaste s'organise en bordure en brosse qui facilite ainsi la fusion de vésicules cytoplasmiques avec la région externe aux cellules. On considère depuis longtemps déjà que la dissolution de la phase minérale de la matrice osseuse est le résultat d'une baisse de pH dans l'aire de résorption. Ce milieu est effectivement maintenu à un pH proche de 5 par libération de protons par l'ostéoclaste. Les protons seraient excrétés par l'intermédiaire, d'une part, d'une ATPase vacuolaire Na^+/K^+ dépendante [34, 35] localisée exclusivement sur la bordure plissée [36] et, d'autre part, par une seconde ATPase Na^+/H^+ [37]. Ces protons sont produits dans la cellule grâce à une anhydrase carbonique cytoplasmique de type II qui induit la production d'ions HCO_3^- et H^+ à partir de CO_2 et H_2O . D'autres mouvements ioniques ont lieu de part et d'autre de la membrane plasmique et, notamment, l'ostéoclaste possède un échangeur chlorure-bicarbonate lui permettant d'évacuer le surplus d'ions HCO_3^- et de prévenir une alcalinisation intracellulaire excessive [38]. Enfin, sur la membrane basale des ostéoclastes on retrouve la présence de pompes de type ATPase $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ dépendantes, permettant la sortie active des ions calcium intracellulaires libérés lors de la résorption du réseau d'hydroxyapatite [39] (**figure 6 p.14**). L'acidité de l'aire de résorption située entre la bordure plissée et la matrice osseuse permettrait donc la dissolution des cristaux d'hydroxyapatite et la libération, sans

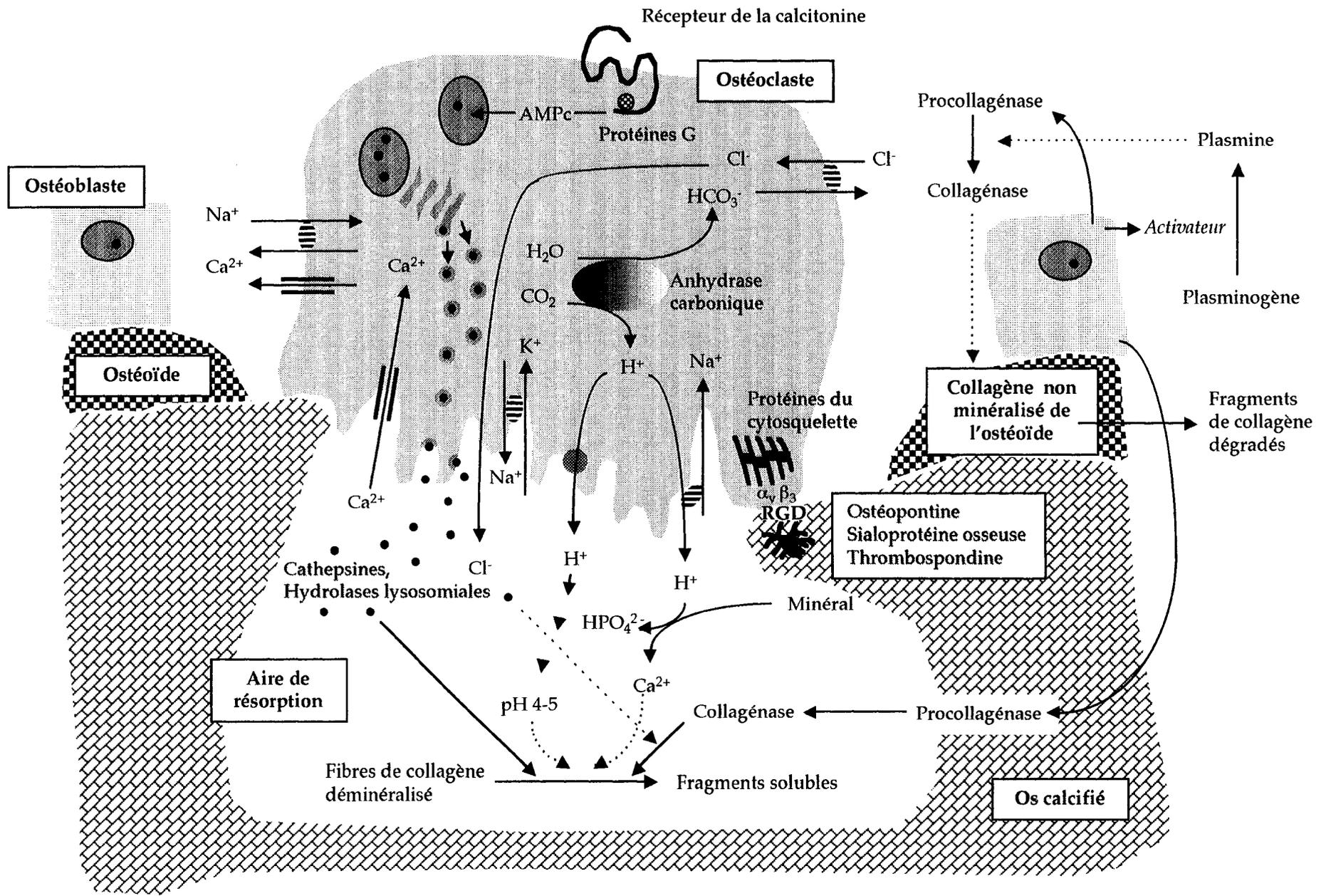


Figure 6 : Représentation schématique hypothétique des différents mouvements ioniques de l'ostéoclaste et du mécanisme de la résorption.

précipitation, du calcium et du phosphore à partir de la phase minérale. En ce qui concerne la phase organique de la matrice osseuse, les ostéoclastes sont également capables de la dégrader, par sécrétion d'enzymes protéolytiques [5, 34, 40] dans la lacune active de la résorption. Selon un mécanisme parallèle à celui des cellules épithéliales qui sont, comme les ostéoclastes, des cellules polarisées, le matériel osseux digéré dans l'aire de résorption pourrait être relargué par transcytose au niveau de la membrane apicale [41].

Cependant, la mise en évidence par immunocytochimie de la présence de récepteurs du mannose 6-phosphate sur la bordure plissée des ostéoclastes [40] soutient l'hypothèse de la dégradation extracellulaire de la matrice organique. En effet, ce récepteur à mannose 6-phosphate présent dans d'autres types cellulaires est connu pour être situé sur la membrane de l'appareil de Golgi et dans les lysosomes primaires, où il permet l'adressage des enzymes lysosomiales vers les lysosomes secondaires.

Le compartiment acide créé par les ostéoclastes correspondrait en fait à un véritable lysosome secondaire [42] dans lequel on retrouve principalement des hydrolases lysosomiales et des cathepsines L, N et B (qui sont des cystéine-protéinases). Les cathepsines, dont l'activité est optimale à pH acide, sont capables de dégrader les liaisons entre les molécules de collagène, qui sont les constituants majeurs de la matrice organique. Les ostéoclastes produisent également une collagénase de type IV, la collagénase neutre (MMP-1) et la gélatinase (MMP-9) (qui seraient actives dans les phases tardives de la résorption) [31, 43], des β -glucuronidases, des hydrolases et les phosphatases tartrate-résistantes, qui sont responsables de la dégradation des protéoglycannes et des autres protéines non collagéniques de l'os [5, 44, 45]. L'activité acide-phosphatase, résistante à l'inhibition par de fortes concentrations en tartrate est caractéristique des ostéoclastes [10]. En cela, les ostéoclastes se différencient des monocytes et des macrophages.

b) Contrôle de la résorption

Des analyses par microscopie électronique sur des ostéoclastes isolés, ont montré que l'ensemble des constituants de la matrice osseuse sont résorbés par les cellules, mais il existe une digestion séquentielle où la déminéralisation doit précéder la résorption du collagène [46]. Au contraire de Kölliker, qui considérait que les cellules qu'il avait nommées ostéoclastes étaient seules responsables de la dégradation lente des phases minérales et organiques de l'os, sans la participation active du tissu osseux ou d'autres cellules osseuses, il apparaît désormais que d'autres types cellulaires osseux, en particulier les ostéoblastes ou les cellules de lignée ostéoblastique, jouent un rôle dans la résorption osseuse, par contrôle de l'activité des ostéoclastes (figure 7 p.17). Il existe, en effet, une sorte de compétition entre les ostéoblastes et les ostéoclastes à la surface matricielle de l'os et différents facteurs affectent l'équilibre des événements contribuant à la formation ou à la résorption de l'os. De plus, d'autres cellules voisines comme les monocytes/macrophages, les lymphocytes, les fibroblastes, ou certaines cellules cancéreuses présentes à la surface de l'os, ont également été identifiées comme étant d'importants régulateurs potentiels du mécanisme de la résorption osseuse, à travers leur production de cytokines, de prostaglandines ou d'autres médiateurs. Ainsi, on distingue la régulation de la résorption ostéoclastique par les agents ioniques, de la régulation par les facteurs hormonaux. La régulation ionique est essentiellement basée sur la concentration en calcium intra- ou extra-cellulaire. Une augmentation de la concentration en calcium extracellulaire, en réponse à la dissolution des cristaux d'hydroxyapatite, entraîne l'arrêt de la résorption [47]. En fait, il s'en suit une augmentation de la concentration en calcium intracellulaire qui désorganise les structures filamenteuses (ou podosomes) grâce auxquelles les ostéoclastes adhèrent à la matrice osseuse, ce qui entraîne leur détachement de cette matrice et donc l'arrêt de la résorption [48]. De même, il semble qu'une augmentation de la concentration en phosphore extracellulaire traduise une diminution de l'activité ostéoclastique. A l'inverse, un pH

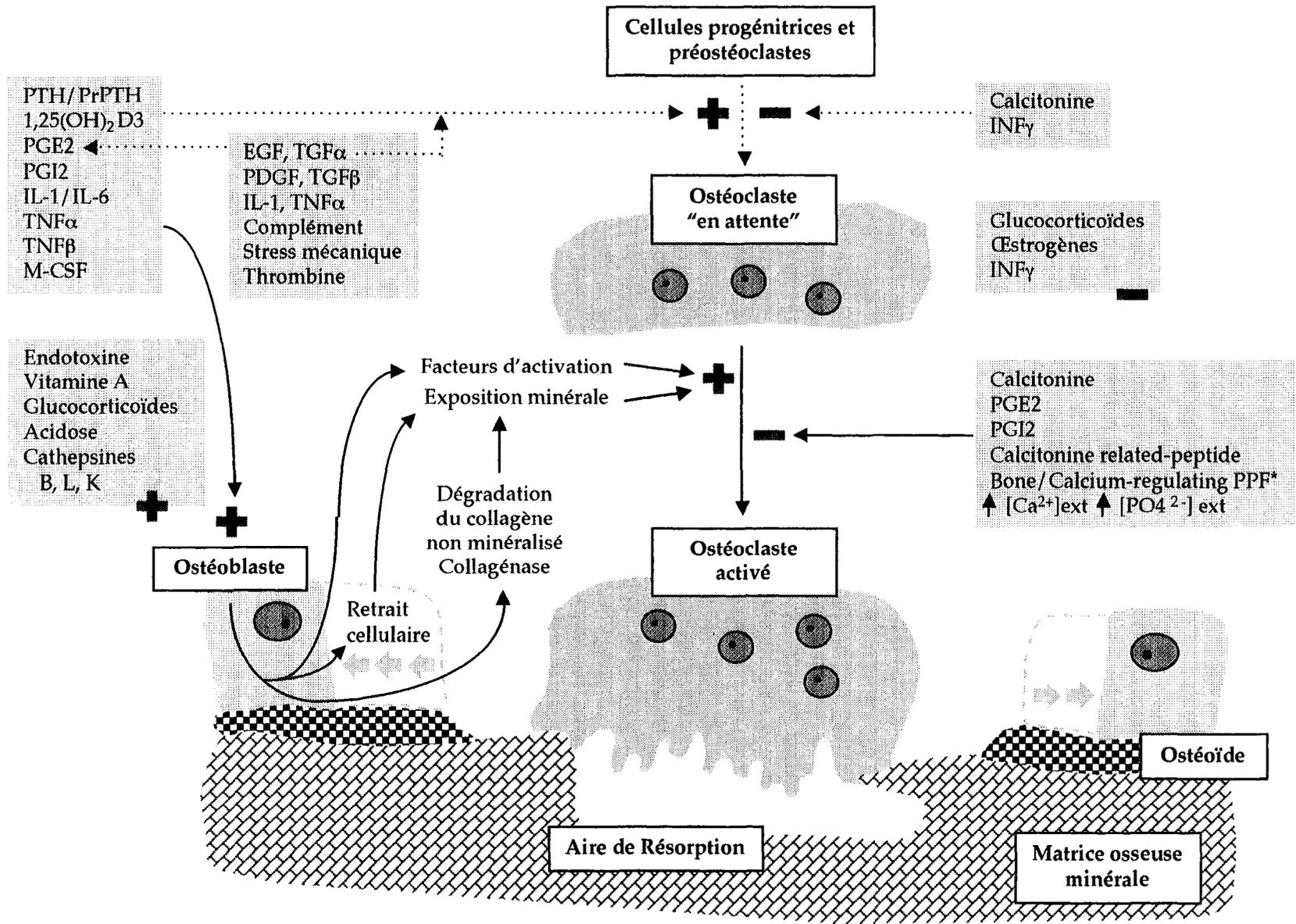


Figure 7 : Représentation schématique du mécanisme d'activation des ostéoclastes et sa régulation. Les agents de stimulation [+] de la résorption sont présentés dans les trois aires grisées à gauche. Les agents avec la PTH activent les ostéoclastes via les ostéoblastes ; ceux avec EGF sont supposés induire la résorption par l'intermédiaire d'un mécanisme médié par PGE2. Enfin les agents comprenant l'endotoxine stimulent la résorption par une voie d'activation encore inconnue. Les agents inhibiteurs de la résorption [-] sont décrits sur la droite ; parmi ceux-ci les œstrogènes et glucocorticoïdes sous certaines conditions *in vitro* inhibent l'activité des ostéoclastes par un mécanisme encore inconnu (selon Vaes G. [5]). * : un peptide pancréatique hypocalcémique a très récemment été isolé du pancréas et inhiberait la résorption ostéoclastique [70].

inférieur à 7.2, en milieu de culture, stimule la résorption d'ostéoclastes isolés [49], en induisant une diminution de la concentration en calcium intracellulaire et en stimulant la liaison des ostéoclastes à la matrice [50]. En dehors de la régulation ionique, de nombreux facteurs biochimiques endocriniens ont un effet indéniable sur l'activité des ostéoclastes, donc sur la résorption osseuse (**figure 7 p.17**).

En considérant l'existence de la barrière des ostéoblastes à la surface osseuse, il est vraisemblable de supposer un rôle actif des ostéoblastes dans l'activation des ostéoclastes. Mais surtout, la plupart des facteurs locaux décrits figure 7 sont sécrétés par les ostéoblastes et correspondent en fait à des agents de communication entre les ostéoblastes et les ostéoclastes. Plusieurs raisons évidentes font de l'ostéoblaste un intermédiaire essentiel lors de l'activation des ostéoclastes : 1) la présence exclusive sur les ostéoblastes de récepteurs de différentes hormones activatrices de la résorption osseuse (parathormone (PTH), $1,25(\text{OH})_2$ vitamine D_3) ; 2) les effets des facteurs stimulant la résorption osseuse comme la PTH, la $1,25(\text{OH})_2$ vitamine D_3 , l'interleukine-1 (IL-1) et les tumor necrosis factors ($\text{TNF}\alpha$ et β) sont augmentés considérablement lorsque des ostéoblastes sont ajoutés à des cultures d'ostéoclastes isolés. Ainsi, l'action des différents facteurs activant la résorption osseuse est le plus souvent indirecte, et la réponse ostéoclastique à ces agents dépend largement de la présence des ostéoblastes, de leur densité et de leur proximité ; 3) enfin, la possibilité de l'action de la collagénase, sécrétée par les ostéoblastes sous une forme antérieure pro-collagénase, à la surface osseuse. En réponse à la PTH, la $1,25(\text{OH})_2$ vitamine D_3 et à la PG-E2, la collagénase permettrait de préparer la surface osseuse aux ostéoclastes et favoriserait donc leur action [5, 51].

En conclusion, la résorption osseuse est globalement le résultat de trois étapes successives qui sont :

- une première étape correspondant à la formation de cellules progénitrices des ostéoclastes dans les tissus hématopoïétiques, suivie de leur dissémination vasculaire

associée à la genèse de pré-ostéoclastes puis d'ostéoclastes dans l'os ;

- une deuxième étape consistant en l'activation des ostéoclastes au contact de l'os minéralisé, par liaison des ostéoclastes à la matrice osseuse, qui permet de créer un micro-compartiment dans les replis de la bordure en brosse. Les ostéoblastes semblent contrôler cette étape par exposition de la matrice osseuse aux ostéoclastes et aux pré-ostéoclastes, et/ou par relargage de facteurs solubles capables d'activer ces cellules ;

- enfin une troisième étape, se traduisant par la résorption à la fois de la phase minérale et de la phase organique du tissu osseux minéralisé, à travers l'action d'agents sécrétés dans la zone délimitée par la bordure plissée. La phase minérale est solubilisée par sécrétion de protons libérés dans la zone de résorption par l'intermédiaire d'une ATPase Na^+/K^+ dépendante localisée sur la membrane. Les protons dans le cytoplasme des ostéoclastes proviennent de l'action d'une anhydrase carbonique sur $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$. Quant au relargage de la matrice organique, il fait suite à l'action de différents enzymes comme les cathepsines et les hydrolases lysosomiques libérées dans le micro-environnement acide de l'aire de résorption.

B.III. LES OSTEOLASTES ET LA FORMATION OSSEUSE

B.III.1. Morphologie et origine des ostéoblastes

A ce jour, on reconnaît 4 stades de différenciations morphologiques et histochimiques aux ostéoblastes : le pré-ostéoblaste, l'ostéoblaste, la cellule bordante et l'ostéocyte.

Les cellules ostéogéniques du stroma médullaire se différencient en ostéoblastes, et le pré-ostéoblaste est le précurseur direct de l'ostéoblaste mature. Les pré-ostéoblastes présentent des caractéristiques morphologiques et biochimiques identiques à l'ostéoblaste mature, comme la forte activité de phosphatase alcaline. Toutefois, les pré-ostéoblastes restent sans activité de biosynthèse. Ces cellules sont localisées le long des ostéoblastes dans l'os.

Les ostéoblastes matures sont des cellules cuboidales polarisées et localisées le long de la matrice osseuse qu'ils sécrètent. Ils présentent un noyau apical, un cytoplasme basophile

riche en réticulum endoplasmique et en mitochondries, et un appareil de Golgi très développé témoignant de la forte activité de biosynthèse de ces cellules (figure 8) [52]. Les caractères biochimiques des ostéoblastes matures correspondent à une forte activité phosphatase alcaline, à la synthèse et à la sécrétion du collagène de type I et de différentes protéines non collagéniques, comme l'ostéocalcine et la

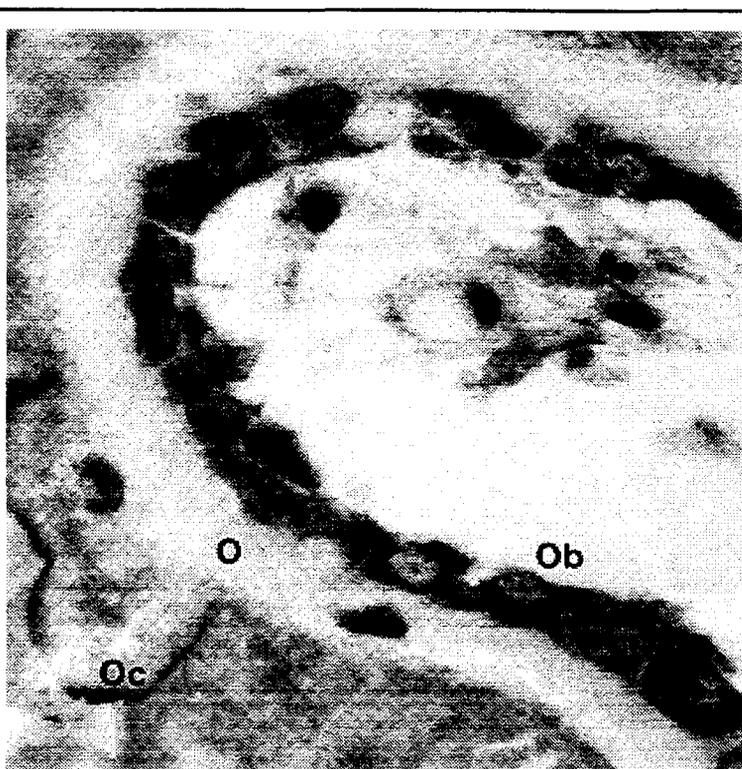


Figure 8 : Coupe histologique décrivant des ostéoblastes différenciés (Ob) synthétisant du tissu osseux non minéralisé (ostéoïde : O) le long de l'os calcifié (Oc) (x100).

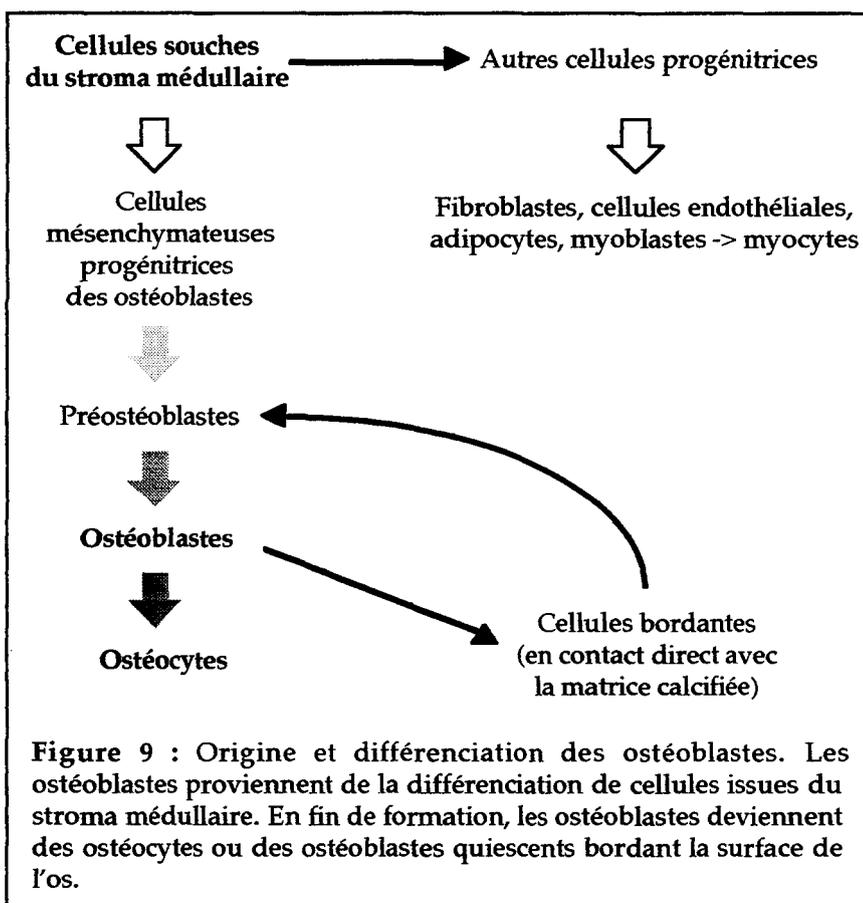
sialoprotéine osseuse [10, 53]. Le collagène de type I semble être d'ailleurs le médiateur de l'expression du phénotype ostéoblastique [54] et participe à la différenciation cellulaire des cellules souches [55]. Concernant la phosphatase alcaline, il sera décrit ultérieurement que, malgré sa capacité à libérer des ions phosphates, et malgré sa forte concentration lors de la formation minérale, il n'a pas encore été franchement établi que cet enzyme joue un rôle direct dans le processus de formation osseuse par les ostéoblastes.

En fin de formation, une minorité d'ostéoblastes se laissent emprisonner dans la matrice osseuse qu'ils viennent de synthétiser. Ils deviennent alors des ostéocytes. Les ostéoblastes et les ostéocytes restent en contact et communiquent par des jonctions cellulaires de type « gap ». Ce réseau permet ainsi le transfert de signaux entre les cellules localisées à la surface de l'os et les ostéocytes enfouis dans la matrice osseuse. Les ostéocytes jeunes se différencient des ostéoblastes par un cytoplasme moins basophile, mais qui demeure riche en réticulum endoplasmique, en mitochondries et en appareil de Golgi. Les ostéocytes moins jeunes sont enfouis plus profondément dans l'os ; ils sont de taille plus petite, de

forme ovoïde et présentent moins d'organelles. Enfin, les ostéocytes âgés se caractérisent par la présence de nombreux lysosomes et par un espace péricellulaire élargi contenant des composants de la matrice osseuse. Il semble, en fait, que l'ostéocyte puisse à la fois produire et détruire la matrice osseuse, au cours d'un processus dont le but serait de maintenir l'homéostasie phosphocalcique. Toutefois, l'existence d'un véritable phénomène d'ostéolyse péri-ostéocytaire n'a jamais été formellement démontrée, et les activités métaboliques sont peu connues dans ces cellules en raison de leur accessibilité difficile.

En fin de formation, certains ostéoblastes matures ne devenant pas des ostéocytes forment alors une couche de cellules bordantes, de forme allongée, le long de la matrice nouvellement synthétisée (**figure 3 p.6**). Les noyaux de ces cellules sont filiformes, le réticulum endoplasmique et les autres organelles sont peu développés. Des jonctions de type « gap » relient également les cellules entre elles, favorisant un contact cellulaire dense, et formant un réseau de canalicules entre ces cellules bordantes et les ostéocytes. Cet alignement cellulaire constitue une barrière physiologique délimitant l'espace médullaire du compartiment intracellulaire. Ces cellules serviraient de support nutritionnel aux ostéocytes puisque des nutriments, des sels minéraux et des facteurs hormonaux circuleraient de la surface osseuse vers les ostéocytes et la moelle osseuse, à travers les canalicules évoquées précédemment. Par ailleurs, il a récemment été mis en évidence que les cellules bordantes pourraient intervenir dans le processus de remodelage osseux [56]. En effet, sous l'action de la PTH et de la $1,25(\text{OH})_2$ vitamine D_3 , les cellules bordantes se rétractent et s'arrondissent par un mécanisme faisant intervenir le cytosquelette. Ce changement morphologique des cellules bordantes serait une des étapes initiales permettant l'accès des ostéoclastes à la matrice osseuse dans le processus de résorption. Enfin, les cellules bordantes sont capables de proliférer et de donner naissance à des ostéoblastes [57]: il semble que la prolifération de ces cellules ostéoblastiques le long de la surface osseuse permette le recrutement ostéoblastique et l'ostéoformation [58].

L'ostéoblaste mature a pour origine, dans l'endoste, des cellules souches présentes dans le stroma médullaire qui prolifèrent et se différencient [59]. Il est admis que les précurseurs cellulaires de l'os et de la moelle se différencient en familles de cellules qui sont : les cellules réticulaires fibroblastiques, adipocytiques, endothéliales, myocytiques et ostéogéniques. Les cellules



souches ostéogéniques sont capables de se différencier en cellules précurseurs de la lignée ostéogénique (**figure 9**) parmi lesquelles on retrouve les ostéoblastes et les chondroblastes. A noter que les cellules provenant de stromas non médullaires, issues d'autres tissus immuno-hématopoïétiques (thymus, rate, ganglions lymphatiques), ne sont pas capables d'induire d'ostéogenèse *in vivo* [59]. Par contre, dans certaines conditions *in vitro* (en présence de collagène, de protéines non collagéniques et de facteurs de croissance), ces cellules peuvent être amenées à se différencier en cellules ostéogéniques.

Dans certaines conditions de culture, les cellules ostéoblastiques prélevées des surfaces de l'endoste ou du périoste, ou les cellules dérivées du stroma médullaire, se différencient *in vitro* en ostéoblastes matures, capables de former du tissu osseux minéralisé. Ainsi, l'ostéogenèse *in vitro*, à partir de ces types cellulaires, se caractérise par la succession invariable d'événements marquant les grandes étapes de la différenciation ostéoblastique :

- 1) la première phase correspond à la prolifération des cellules précurseurs et à l'expression de gènes précoces associés à la prolifération rapide des cellules (oncogènes *fos* et *myc*,

histone H4) [60, 61] ; 2) la prolifération cesse à confluence des cellules et certains gènes associés à la production de la matrice extracellulaire sont alors exprimés (collagène, fibronectine, TGF β), les cellules synthétisent d'ailleurs du collagène de type I qui permet la formation d'une matrice extracellulaire. A ce stade, de nombreuses interactions cellule-cellule et cellule-matrice sont rendues possibles par l'intermédiaire de motifs de type RGD [62] présents dans l'ostéopontine, la fibronectine, le collagène de type I et la sialoprotéine osseuse, ou de motifs de type glycyl-histidine-lysine également retrouvés dans la chaîne α_2 du collagène de type I [63]. De plus, des interactions étroites existent entre les intégrines et le cytosquelette et stimulent l'expression de gènes caractérisant la différenciation des ostéoblastes (gènes de la phosphatase alcaline, de l'ostéocalcine, de l'ostéopontine, de la sialoprotéine osseuse et du collagène de type I). L'expression de ces gènes suggère un rôle des protéines dans la minéralisation de la matrice puisque la minéralisation est associée à l'expression de gènes tardifs de la différenciation ostéoblastique, en particulier ceux de l'ostéocalcine et de la sialoprotéine osseuse [61] ; 3) la dernière phase est celle de la minéralisation de la matrice collagénique en présence de calcium et de phosphate.

La différenciation ostéoblastique est donc un processus séquentiel mettant en jeu de nombreuses interactions entre les cellules et la matrice. La régulation de ce processus est particulièrement complexe, puisque la différenciation peut être contrôlée à chacune des étapes. En conclusion, bien que les étapes précises de la différenciation ne soient pas parfaitement connues, on considère qu'*in vivo*, à partir des cellules souches du stroma médullaire, les cellules ostéogéniques se différencient en pré-ostéoblastes, puis en ostéoblastes et enfin en ostéocytes ou en cellules bordantes (**figure 9** p.22).

B.III.2. La formation osseuse ([100] pour revue)

a) Mécanisme général de la formation osseuse

L'ostéoblaste mature synthétise essentiellement du collagène de type I qui représente la substance organique majeure de la matrice osseuse. La synthèse et

l'assemblage des chaînes α du collagène de type I seront décrites ultérieurement. Ces événements participent largement et sont à l'origine de la formation de la matrice osseuse. Parallèlement, des interactions spécifiques entre ces fibres et certaines molécules produites par les ostéoblastes (ostéonectine, fibronectine, protéoglycannes) s'établissent au cours du dépôt de la matrice, avant la minéralisation [64]. Ces interactions permettent généralement une stabilité moléculaire de ces différentes molécules, les rendant biologiquement actives lorsqu'elles sont en contact avec le milieu extracellulaire ou avec les cellules elles-mêmes. En dehors de ces effets directs de la matrice extracellulaire osseuse sur l'activité cellulaire, le collagène présente des activités chimiotactiques à l'égard des précurseurs des ostéoblastes. Enfin, cette matrice collagénique arrangée en fibrilles assure à la fois une résistance mécanique aux forces de compression, et une certaine élasticité.

En plus du collagène de type I, les ostéoblastes synthétisent différentes protéines non collagéniques. Parmi ces nombreuses protéines, certaines contiennent des résidus γ -carboxyglutamiques (Gla ou γ Glu) dont la carboxylation est dépendante de la vitamine K :

- 1) l'ostéocalcine ou BGP (Bone Gla Protein) est spécifiquement synthétisée par les ostéoblastes. Il sera précisé ultérieurement que cette protéine présente une affinité pour les ions calcium, mais aucun rôle ne lui est attribué dans le processus de minéralisation. En outre, l'ostéocalcine a des propriétés chimiotactiques pour les ostéoblastes et leurs précurseurs ;
- 2) la protéine matricielle MGP (Matrix Gla Protein) est présente dans l'os immature et le cartilage.

D'autres protéines produites par les ostéoblastes se caractérisent par la présence de la séquence tripeptidique RGD (Arg-Gly-Asp) spécifique de la liaison aux récepteurs de type intégrine et favorisant l'étalement des cellules à la matrice : 1) la fibronectine est abondante dans l'os fœtal et immature. Elle possède de nombreux sites de liaison, dont celui au collagène, si bien qu'on lui confère un rôle probable dans l'organisation

structurale de la matrice extracellulaire immature ; 2) la thrombospondine, en plus des séquences RGD, possède différents sites de liaison aux ions calcium. Comme pour la fibronectine, ces propriétés lui confèrent un rôle potentiel dans l'organisation structurale de la matrice extracellulaire ; 3) l'ostéopontine (Bone Sialoprotein I, ou 44kDa Bone Phosphoprotein, ou pp60) est une glycoprotéine acide majeure de l'os immature. Elle stimulerait la liaison des ostéoblastes et l'adhérence des ostéoclastes ; 4) la sialoprotéine osseuse (Bone Sialoprotein II ou BSP) a les mêmes propriétés que l'ostéopontine et participerait ainsi à l'organisation et à la synthèse de la matrice extracellulaire ; 5) la Bone Acidic Glycoprotein (BAG-75) est également synthétisée par les ostéoblastes et se lie activement aux protéoglycannes de l'os, mais son rôle reste non élucidé.

Une dernière glycoprotéine acide est synthétisée non spécifiquement par les ostéoblastes : l'ostéonectine (Osn, SPARC, BM-40). Elle est abondante dans l'os immature, se lie fortement aux ions calcium, au collagène et à l'hydroxyapatite, si bien qu'elle pourrait être impliquée dans l'initiation de la minéralisation et dans l'organisation structurale du tissu osseux minéralisé [65, 66].

Les ostéoblastes synthétisent également différents protéoglycannes, parmi lesquels un protéoglycane de grande taille (600kDa), isolé uniquement dans l'os immature. Il semble en effet que celui-ci soit dégradé avant la minéralisation de l'os. Deux autres protéoglycannes de plus petite taille ont également été isolés dans l'os et sont sécrétés par les ostéoblastes : le biglycan (PG-I) et la décorine (PG-II). Ces deux petits protéoglycannes pourraient jouer un rôle dans l'organisation structurale du tissu conjonctif osseux et dans l'initiation de la minéralisation [65]. Enfin, *in vitro*, les cellules osseuses en culture synthétisent des protéoglycannes de type héparane-sulfate. Ces derniers pourraient jouer un rôle dans le contrôle de la croissance des fibrilles de collagène et dans la régulation de la croissance cellulaire par sa liaison aux facteurs de croissance.

Parallèlement, des études récentes sur cultures d'ostéocytes isolés de poulet ont décrit l'expression de gènes et la présence intracellulaire de différentes protéines parmi

lesquelles on retrouve du collagène de type I, de l'ostéopontine, de l'ostéocalcine et de l'ostéonectine. Ces résultats montrent que les ostéocytes auraient, comme les ostéoblastes, la capacité d'altérer la composition de la matrice extracellulaire qui les entoure, par production et sécrétion de ces protéines [67].

b) Contrôle de la production de la matrice osseuse

La formation osseuse de l'endoste est régulée de façon excessivement complexe par de nombreux facteurs hormonaux et locaux qui interagissent entre-eux [10, 68] (**figures 10-A et 10-B p.27-28**).

Ainsi, la prolifération et la différenciation des ostéoblastes est sous la dépendance de différentes hormones dont les effets sont induits, modulés, diminués ou amplifiés par de nombreux facteurs locaux à effet cellulaire.

Les activités de formation, comme de résorption, sont donc susceptibles d'être régulés tout au long de la succession d'événements allant de la prolifération des cellules souches, à la différenciation finale en cellules matures.

La succession de ces événements dépend non seulement de la présence des hormones et facteurs locaux, mais également du contact entre les cellules et les protéines matricielles retrouvées dans la matrice osseuse.

Toutefois, même si les effets de tous ces facteurs ne sont plus à démontrer, des études récentes menées *in vitro* ont mis en évidence la sensibilité de cellules ostéoblastiques à des contraintes mécaniques entraînant la production des protéines de la matrice organique, indépendamment de la régulation hormonale [69].

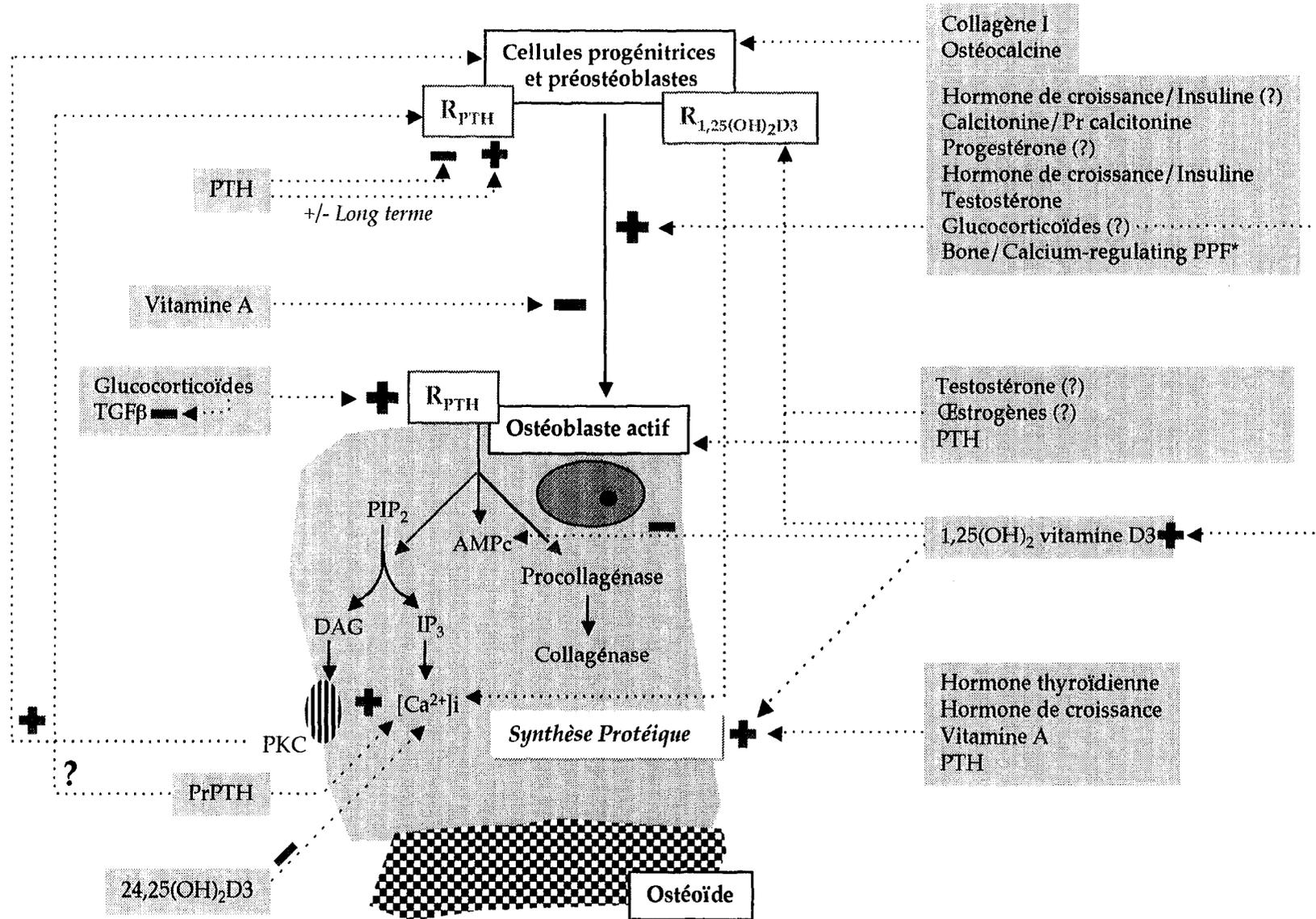


Figure 10-A : Représentation schématique du processus de régulation par les facteurs hormonaux de la prolifération et de l'activité des ostéoblastes. On observe pour la parathormone (PTH) des effets variables en fonction du temps ; de plus, une activation du récepteur de la PTH entraîne : 1) la sécrétion d'IL-6 et de M-CSF qui favorisent la différenciation des ostéoclastes, 2) la sécrétion de TGFβ qui diminue la différenciation des ostéoclastes. * : un nouveau peptide a très récemment été isolé du pancréas et favoriserait la prolifération d'ostéoblastes en culture [70].

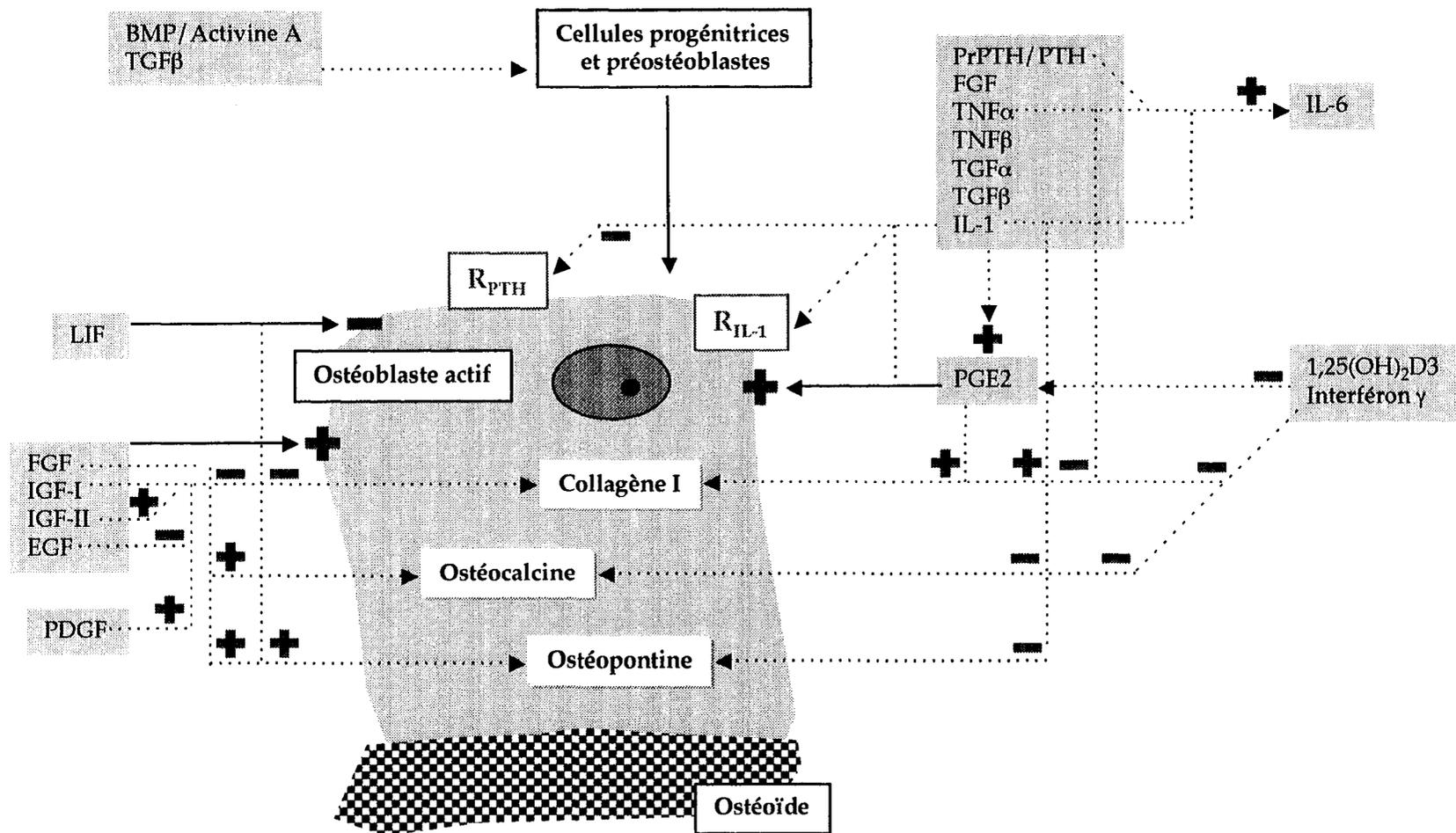


Figure 10-B : Représentation schématique du processus de régulation par les facteurs locaux de la prolifération et de l'activité des ostéoblastes. Les effets de ces facteurs d'origine ostéoblastique sont variables et se traduisent généralement par un contrôle de la synthèse, par ces cellules, des protéines majeures retrouvées dans l'ostéoïde.

	Résorption		Formation	
	Recrutement cellulaire	Activité cellulaire	Recrutement cellulaire	Activité cellulaire
Hormones				
- PTH	+	+	+	-
- 1,25(OH) ₂ D3	+	+	o	-
- Calcitonine	-	-	o	o
- Glucocorticoides	o	o	-	-
- Hormones thyroïdes	+	+	o	o
- Insuline	o	o	+	+
- Hormone de croissance	o	o	+	+
- Œstrogènes	o	-	+	+
Facteurs de croissance				
- EGF	+	+	+	-
- PDGF	+	+	+	-
- FGF	o	o	+	o
- TGFβ*	-	+	+	+
- IGF-I	o	o	+	+
Cytokines				
- IL-1	+	+	+	-
- PGE ₂	o	+/-	+/-	+/-
- TNFα	+	+	+	-
- IFNγ	-	-	-	-
- IL-6	+	o	o	o

Tableau 2 : Effets des principaux facteurs hormonaux et locaux sur les tissus osseux.

* La préparation OHC, à partir de laquelle nos travaux ont été menés, a d'ailleurs fait l'objet d'une étude *in vitro* de la prolifération d'ostéoblastes. Le TGFβ1, qui est présent en quantité non négligeable dans l'os comme dans l'OHC, inhibe la prolifération ostéoblastique [71].

c) Minéralisation de la matrice osseuse

La minéralisation d'un tissu correspond au dépôt d'une substance minérale au sein d'une matrice organique extracellulaire. Chez les mammifères en général, et chez l'homme en particulier, il s'agit d'une calcification, donc d'un dépôt de sel de calcium : le phosphate de calcium. Au cours de l'ostéogenèse, la calcification aboutit à la formation d'os à partir de la matrice protéique ostéoïde. Un minéral amorphe de calcium et de phosphate se dépose dans un premier temps à la surface osseuse, puis se transforme en

une phase cristalline de la famille des apatites [72].

La calcification, ou minéralisation ne correspond pas seulement à la précipitation simultanée des ions phosphate et calcium au sein de la matrice organique. Elle résulte également de l'action, par un mécanisme excessivement complexe, de facteurs multiples présents dans la matrice organique, les cellules et leurs organites tels que des enzymes, des vitamines, des hormones, des cytokines et des ions. Pour ces raisons, le contrôle de la minéralisation est globalement apparenté à celui de la formation de l'os évoqué précédemment.

La cristallisation minérale de la matrice n'est pas spontanée et demande une initiation de la minéralisation par un processus de nucléation. Dans une solution ionique, la nucléation et la croissance d'un cristal se produisent grâce à l'énergie dérivée de la saturation en ions. Lorsque cette énergie est totalement dérivée de cette saturation ionique, la nucléation est dite homogène. Dans l'os, on sait effectivement que la concentration en ions phosphate et calcium est saturée dans le milieu extracellulaire par rapport à la phase minérale. Toutefois, dans les conditions biologiques normales, on observe le plus souvent une nucléation dite hétérogène où la formation du premier cristal se fait à la surface de particules d'origine étrangère. C'est ainsi que de nombreux éléments de la matrice organique osseuse sont considérés comme initiateurs potentiels de la nucléation hétérogène. Parmi ces constituants, le collagène de type I reste un site probable de nucléation, entre les fibrilles de collagène (dans une partie moins riche en acides aminés occasionnée par le décalage des chaînes de tropocollagène les unes par rapport aux autres) [73, 74]. Certaines protéines retrouvées dans la matrice osseuse sont également capables de promouvoir le processus de nucléation [65]. Parmi celles-ci, l' α_2 HS glycoprotéine, l'ostéocalcine, l'ostéonectine et les phosphoprotéines (notamment la sialoprotéine osseuse) présentent une forte affinité pour les ions calcium et pourraient contribuer à la minéralisation du collagène [75, 76].

D'autre part, le rôle des ostéoblastes pendant la nucléation hétérogène fait référence à la théorie des « vésicules matricielles » [77, 78, 79]. En effet, ces vésicules correspondraient à des structures extracellulaires ayant pour origine les ostéoblastes. Ces vésicules, situées à proximité du front de calcification, accumuleraient un nombre croissant de cristaux d'hydroxyapatite qui finiraient par provoquer l'éclatement de la membrane vésiculaire. Cette dernière serait biologiquement active et contiendrait une batterie d'enzymes, de protéines et de lipides nécessaires à l'initiation de la minéralisation. Le rôle de ces vésicules matricielles dans le processus de nucléation reste controversé puisqu'il a été montré que le début de la croissance cristalline peut se produire exclusivement dans les espaces des fibrilles de collagène. L'agrégation des fibrilles de collagène natives produit un espace suffisant à l'initiation de la nucléation. Après accumulation des ions calcium et phosphate, les cristaux envahissent ces espaces intermoléculaires le long de l'axe longitudinal des fibrilles de collagène pour, enfin, les recouvrir totalement.

Toutefois, des travaux récents dans le tendon [80] ont montré que les premiers cristaux d'apatite ne sont ni très concentrés dans les espaces, ni alignés le long des fibrilles de collagène. L'hypothèse proposée est que l'initiation de la calcification du tissu osseux se ferait au sein des vésicules matricielles, puis les dépôts minéraux se propageraient aux fibrilles [81]. De récents travaux font état de la présence d'inhibiteurs du processus d'agrégation et de croissance cristalline comme étant le pyrophosphate, les glycosaminoglycannes et le citrate. En fait, la disparition totale de ces inhibiteurs constituerait une étape indispensable pour permettre au mécanisme de calcification de se produire.

D'un point de vue hormonal, la parathormone, en dehors de son activité anabolisante sur les ostéoblastes, augmente la concentration en calcium sérique par stimulation de la résorption osseuse et de l'absorption calcique intestinale. La $1,25(\text{OH})_2$ vitamine D_3 stimule également l'absorption intestinale des ions calcium.

Enfin, les ostéoblastes restent les cellules essentielles du contrôle de l'initiation et de la propagation de la phase minérale. Ces cellules ont la capacité de réguler l'ensemble des mécanismes par la synthèse, l'organisation et le dépôt du collagène et des protéines non collagéniques. De plus, les ostéoblastes contrôlent le transport des ions calcium et phosphate vers la matrice organique, élaborant ainsi une matrice calcifiable, et produisent des structures comme les vésicules matricielles susceptibles d'être impliquées dans les mécanismes de calcification.

En raison d'une forte activité phosphatase alcaline principalement membranaire des ostéoblastes, on suggère un rôle clé (bien que non clairement établi) de cet enzyme dans le processus de minéralisation. Toutefois, il a récemment été démontré, *in vitro*, que des cellules de type ostéoblaste sont susceptibles d'initier un phénomène de biominéralisation en présence de phosphate organique sous forme de Ser-P, de Thr-P ou de β -glycérophosphate. Ces agents occasionnent effectivement un dépôt minéral dont l'arrangement cristallin est similaire à celui de l'os humain. Sachant que la formation minérale est inhibée en présence de pyrophosphate ou de lévamisole (inhibiteur de la phosphatase alcaline), ce processus de formation impliquerait donc une activité phosphatase alcaline [82, 83]. Des études histochimiques montrent que la phosphatase alcaline est exprimée essentiellement dans les ostéoblastes matures et les ostéocytes jeunes, alors que les cellules bordantes et les pré-ostéoblastes sont faiblement marqués [53]. De plus, les vésicules matricielles dans lesquelles s'accumulent les ions phosphate et calcium, et où l'hydroxyapatite cristallise, sont riches en phosphatase alcaline. L'emploi d'inhibiteurs de l'activité phosphatase alcaline (tels que le béryllium et le lévamisole) a également pour effet d'empêcher la calcification des vésicules matricielles [84]. Cet enzyme pourrait donc jouer un rôle dans la calcification par augmentation de la concentration en phosphate inorganique et par inactivation des molécules de pyrophosphate inhibitrices de la minéralisation.

D'autre part, les ostéoblastes agissent sur la concentration en ions phosphate et calcium en inhibant la formation de pyrophosphates par les ATPases, pyrophosphohydrolases et phosphatases alcalines. Enfin, récemment il a été mis en évidence la présence d'une pompe $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ dans les membranes des ostéoblastes [85]. Mais il n'est pas encore clairement établi que les ostéoblastes favorisent directement le transport du calcium du milieu extracellulaire vers le site de nucléation.

En résumé, la minéralisation correspond à un phénomène biphasique de nucléation puis de propagation (**figure 10-C** p.34). Les événements de la minéralisation se caractérisent par : 1) une calcification normale débutant dans la matrice organique, à l'extérieur des cellules ; 2) le maintien des concentrations en ions phosphate et calcium dans les fluides extracellulaires, favorable à la formation de la phase minérale de forme cristalline de phosphate de calcium. Toutefois les concentrations locales en ions calcium et phosphate sont insuffisantes pour engendrer une précipitation spontanée de phosphate de calcium, si bien qu'une initiation ou nucléation est requise ; 3) la nucléation se fait au niveau de vésicules matricielles ou dans les espaces libres internes des fibrilles de collagène de type I. Puis, l'augmentation de la concentration en ions calcium et phosphate (respectivement par la constitution de canaux calciques et par l'hydrolyse d'esters phosphatés) crée les conditions ioniques optimales au dépôt minéral ; 4) la propagation de la calcification s'opère par la rupture membranaire des vésicules matricielles suite à la pénétration des cristaux. L'éclatement des vésicules matricielles engendre alors l'exposition des cristaux qui serviront de foyers de nucléation secondaire, par utilisation des ions phosphate et calcium disponibles dans le fluide extracellulaire.

Les cellules, et plus particulièrement les ostéoblastes, contrôlent donc toutes ces phases de la calcification au cours de la synthèse de la matrice organique, et lors de la sécrétion des vésicules matricielles.

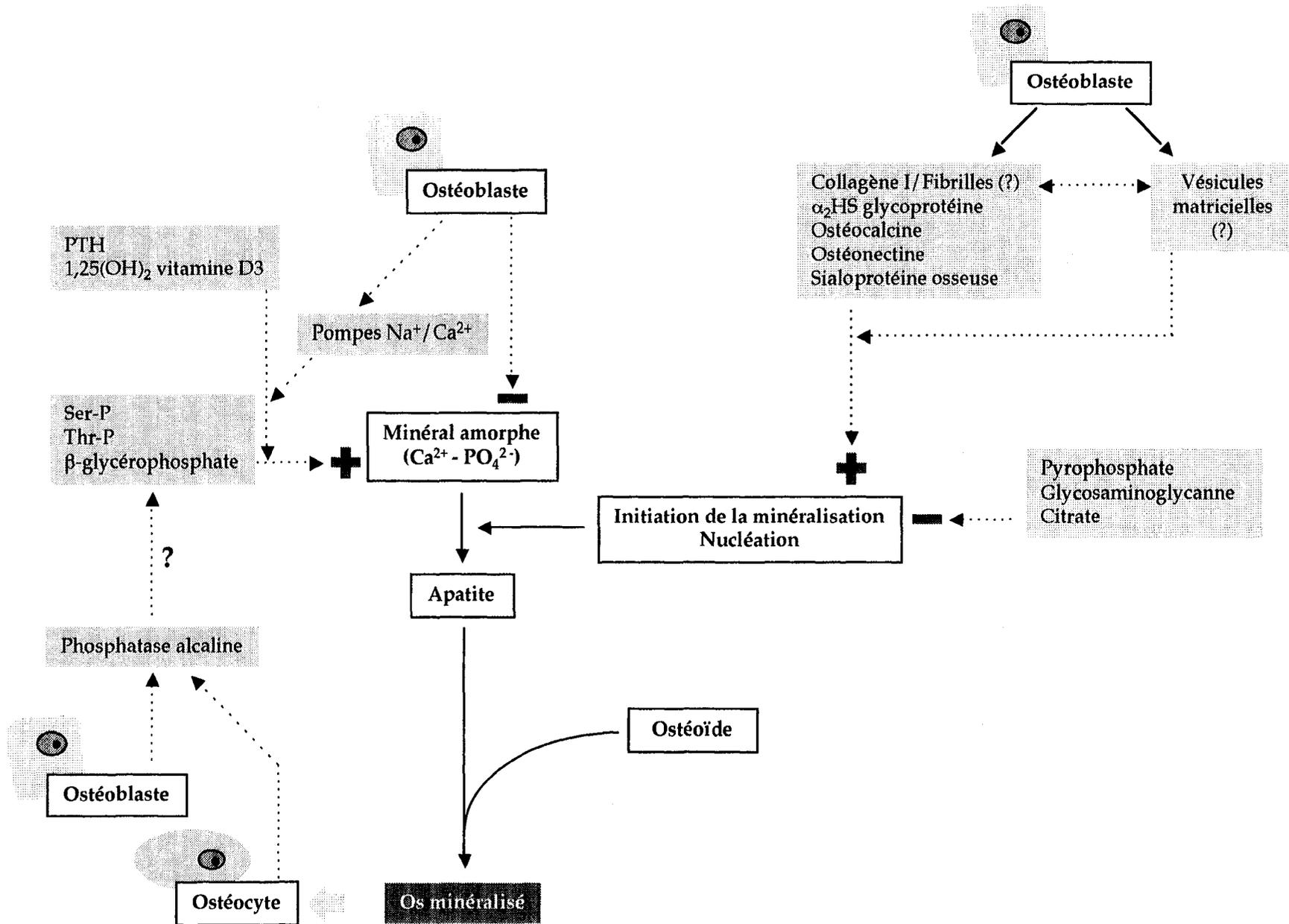
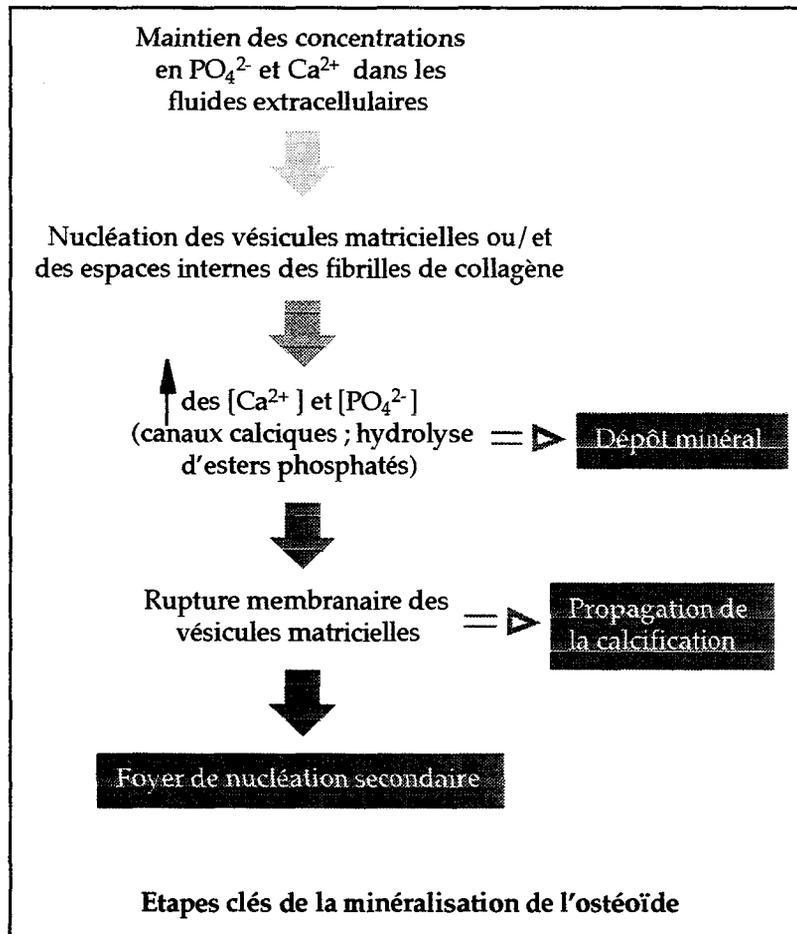


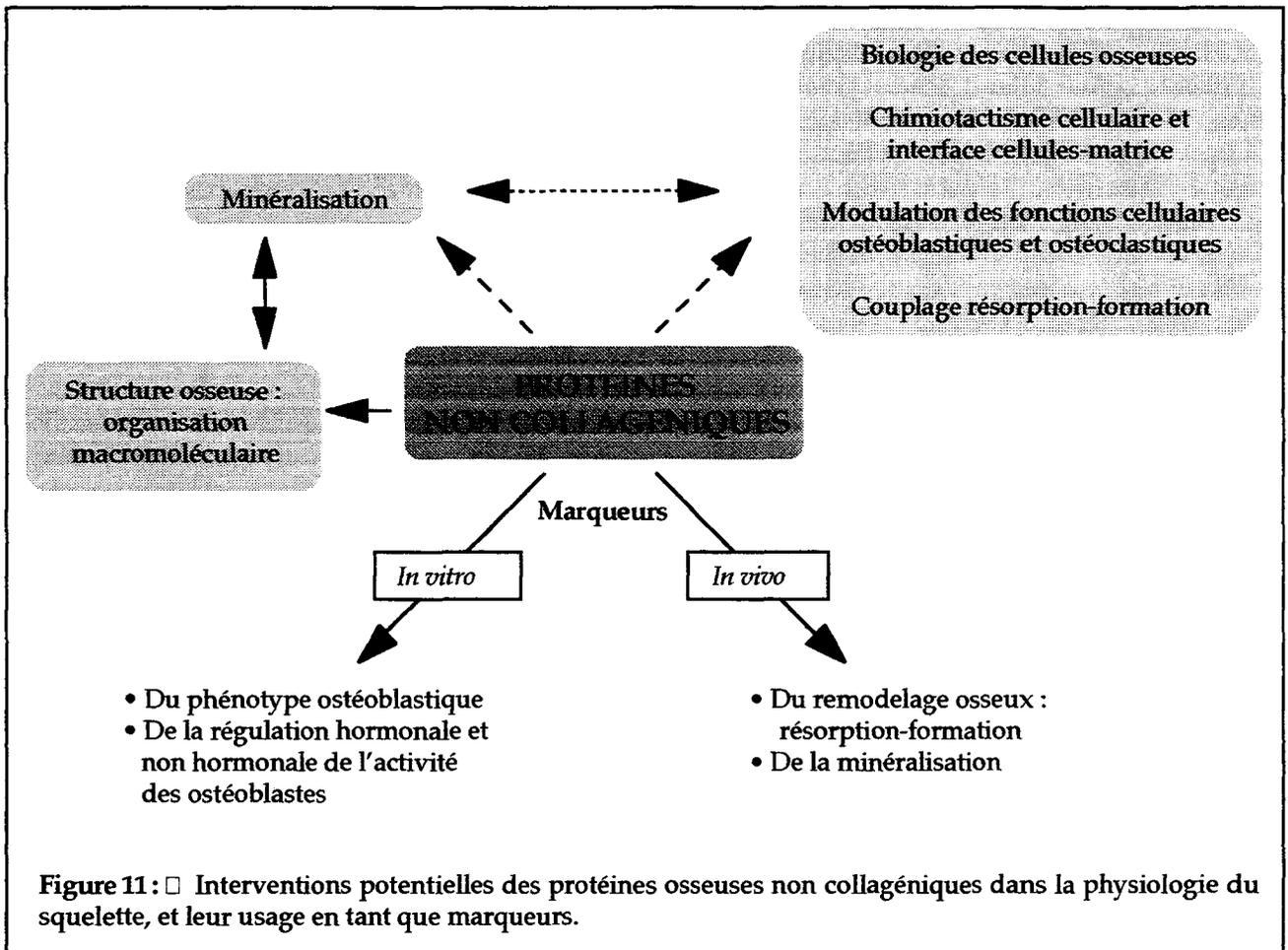
Figure 10-C : Représentation schématique hypothétique du contrôle du processus de minéralisation de l'ostéoïde.



C. LES PROTEINES DE LA MATRICE ORGANIQUE OSSEUSE

Le tissu osseux est constitué d'un compartiment extracellulaire minéralisé correspondant à la matrice extracellulaire. La fraction organique de cette matrice est constituée essentiellement par du collagène de type I qui représente 90% de la masse osseuse organique extracellulaire. Les 10% restants sont attribués aux protéines dites non collagéniques, et cette fraction représente approximativement 2% de la masse osseuse totale. En raison de leur faible pourcentage et de la difficulté à les extraire du tissu osseux, les protéines non collagéniques sont longtemps restées méconnues. En effet, ces protéines ne sont pas extractibles en conditions classiques, mais nécessitent l'usage de tampons dénaturants permettant leur purification sans agrégation, ni dégradation. De plus, l'alternance d'extractions en conditions dissociant le minéral (déminéralisation) et non dissociantes, a permis de préciser la distribution des protéines dans les phases minérales (incluses dans les cristaux d'hydroxyapatite) et organiques (interagissant avec les fibrilles de collagène). Toutefois, l'emploi de ces conditions d'extraction drastiques ne permet pas d'assurer le maintien de l'activité biologique et des propriétés physiologiques de ces protéines. Ce n'est que depuis ces quinze dernières années que les protéines non collagéniques ont été étudiées, et qu'on leur accorde désormais différents rôles potentiels dans les processus de formation et de résorption osseuses.

L'expression et la synthèse de la plupart de ces protéines non collagéniques ont lieu dans le squelette (par les ostéoblastes) et certaines d'entre elles sont spécifiques de l'os. Ces dernières jouent probablement un rôle majeur dans plusieurs aspects du métabolisme osseux (**figure 11** p.37), comme 1) la nucléation et la croissance des cristaux d'hydroxyapatite, 2) la prolifération et la maturation des cellules osseuses au cours des différents stades de développement de l'os, par leurs propriétés chimiotactiques et d'adhésion. D'autres protéines d'origine extra-osseuse circulent dans le sang et les liquides interstitiels puis sont piégées dans la phase minérale en raison de leur affinité pour l'hydroxyapatite. Leur fonction n'est donc pas nécessairement limitée à l'os.



Les taux d'expression de ces protéines non collagéniques sont variables selon les espèces et l'âge, si bien que la présence de certaines protéines à des stades variables du développement doit influencer le métabolisme des cellules osseuses. En dehors de leur intervention dans la physiologie osseuse, les protéines de la matrice servent de marqueurs phénotypiques des cellules qui les synthétisent (les ostéoblastes) et de marqueurs potentiels du remodelage osseux lors de l'analyse clinique de maladies métaboliques osseuses. On retrouve effectivement certaines de ces protéines dans la circulation sanguine, qui reflètent alors l'activité des ostéoblastes.

De même, des produits de clivage des protéines osseuses peuvent être dosés afin d'évaluer l'activité des ostéoclastes. La distribution des protéines majeures d'origine osseuse et plasmatique est détaillée dans le **tableau 3** page suivante (la liste donnée n'est nullement exhaustive et les concentrations indiquées ne sont qu'indicatives, puisque ces valeurs varient avec l'âge et l'espèce étudiée).

Protéines	Répartition	Distribution
<i>Origine osseuse</i>		
• Collagènes		
- Collagène de type I	90% des protéines	Constitue une trame fibrillaire qui sera ensuite minéralisée
- Collagène de type V	3% du collagène	
- N-propeptide du type I	5% des PNC:Protéines Non Collagéniques(fœtus)	2 populations, l'une liée à la phase organique, l'autre à la phase minérale
• Protéoglycannes	jusqu'à 10% des PNC	
- biglycan		Lié au minéral, péricellulaire
- décorine	le plus abondant dans la matrice osseuse	Lié aux fibres de collagène
• Protéines à séquence RGD		
- Sialoprotéine osseuse	12% des PNC	Présente dans les phases minérale et organique
- Ostéopontine	2% des PNC	2 populations (au moins chez le rat), liée essentiellement au minéral et peu à la matrice
- Thrombospondine		
- BAG 75		
• SPARC/Ostéonectine	jusqu'à 20% des PNC (fœtus)	Liée essentiellement au minéral, avec une affinité variable selon l'espèce
• Gla-protéines		
- Ostéocalcine	jusqu'à 20% des PNC	Liée au minéral (pas seulement?)
- Gla protéine matricielle		Liée à la matrice (pas seulement?)
- Protéine S		
• Facteurs de croissance morphogénétiques (BMP)		
- TGF- β	> 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$, principal réservoir de l'organisme	
- IGF		
<i>Origine plasmatique</i>		
• α_2 HS-glycoprotéine/ Fétuine bovine) Composants d'origine plasmatique les plus	Toutes les protéines exogènes sont liées à la phase minérale
• Albumine) abondants	
• Immunoglobulines		
• Transferrine		
• $\alpha 1$ antitrypsine		
• Apo A1 lipoprotéine		
• Hémoglobine		

Tableau 3 : Distribution des protéines majeures retrouvées dans le tissu osseux

L'exposé ne traitera pas des cytokines et protéases dont les rôles fonctionnels ont été décrits précédemment.

C.I. LES COLLAGENES

Les collagènes sont les molécules les plus abondantes de l'organisme où ils représentent 25% des protéines totales. Dans le tissu osseux, les collagènes constituent 90% du contenu protéique ; on y retrouve en grande majorité du collagène de type I, une

faible quantité de collagène de type V, et des traces de types III, XI et XIII.

Du point de vue structural, le collagène est défini par la présence d'un triplet Gly-X-Y dans sa séquence peptidique, où X est généralement un résidu de proline (30%) et Y un résidu de 4-hydroxyproline (30%). La composition en acides aminés des molécules de collagène est propre à chaque espèce. Mais la glycine occupe environ 30% des positions et la proline 25%. De plus, de nombreux résidus de proline et de lysine y sont chimiquement modifiés (modification post-traductionnelle), respectivement en 4-hydroxyproline et en 5-hydroxylysine (**figure 12**), qui composent approximativement 25% de l'ensemble des résidus de la chaîne. Cette séquence Gly-X-Y très caractéristique impose à la chaîne une

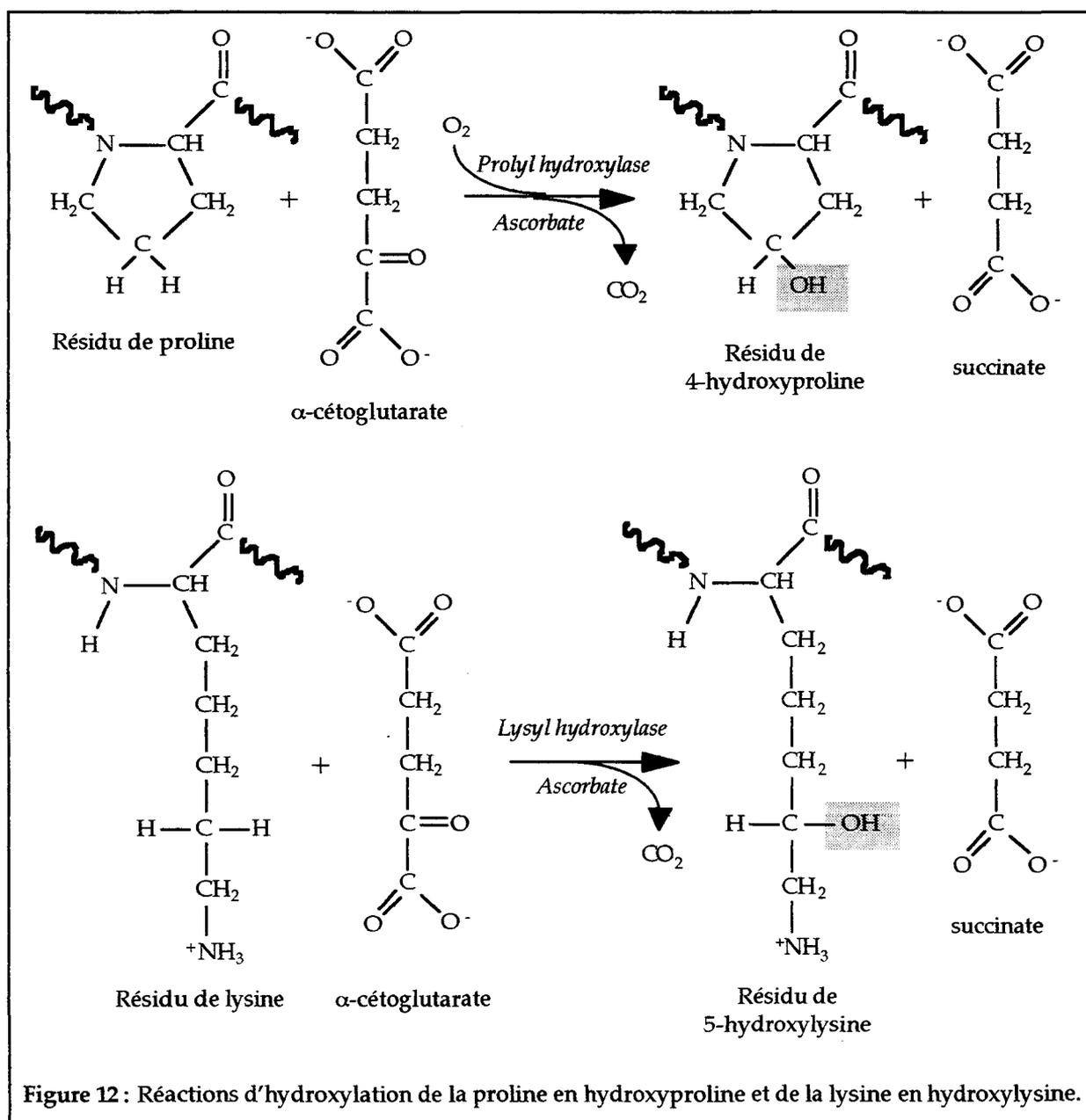


Figure 12 : Réactions d'hydroxylation de la proline en hydroxyproline et de la lysine en hydroxylysine.

conformation en hélice gauche de seulement trois résidus par tour. Or, la chaîne de collagène, appelée aussi tropocollagène, est composée de l'arrangement de trois hélices gauches enroulées les unes autour des autres en super hélice droite. Puisque chaque chaîne de tropocollagène est une hélice à trois résidus d'acides aminés par tour, les acides aminés placés en multiple de trois dans une chaîne donnée sont tous exceptionnellement proches des deux autres chaînes ; ainsi, les contacts intimes se présentant le long de l'axe central de la triple hélice laissent un espace juste suffisant pour l'atome d'hydrogène de la chaîne latérale de la glycine, tout autre résidu que la glycine, plus volumineux, écarterait les trois brins de collagène les uns des autres. Comme la glycine, la proline joue un rôle essentiel dans la conformation de la molécule de tropocollagène. En effet, les noyaux pyrrolidones de la proline se repoussent par encombrement stérique et excluent toute flexibilité.

La conformation étirée de cette triple hélice de tropocollagène est donc responsable de la forme des fibres de collagène : une molécule de tropocollagène est longue d'environ 300nm pour un diamètre de 1,5nm. Les

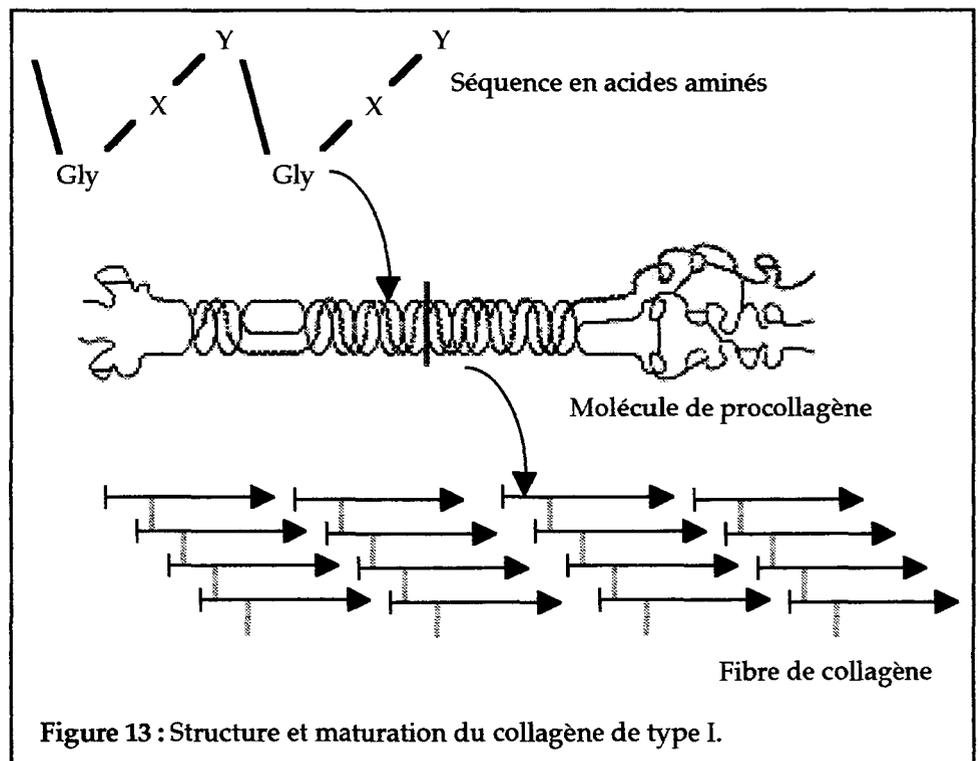
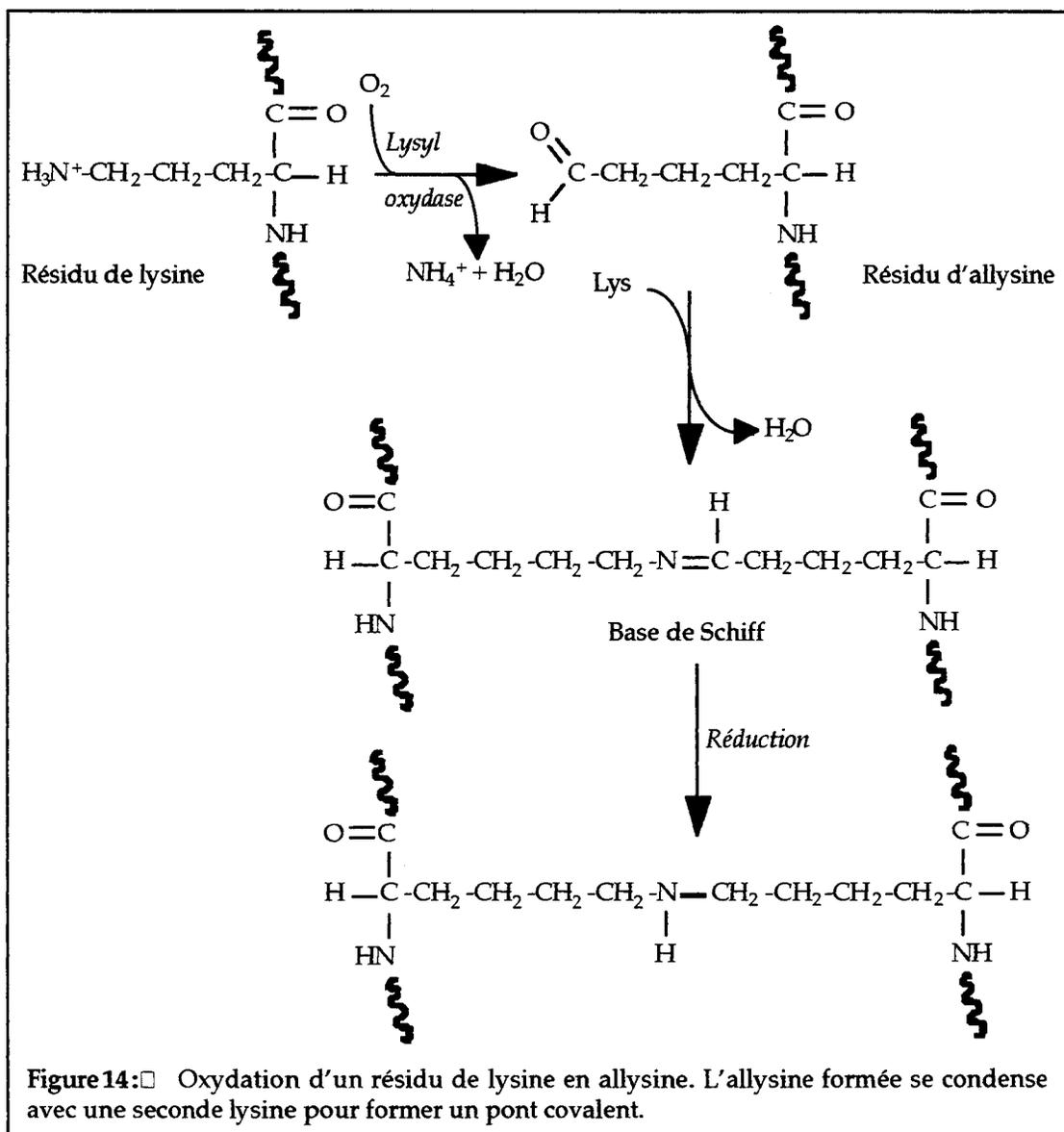


Figure 13 : Structure et maturation du collagène de type I.

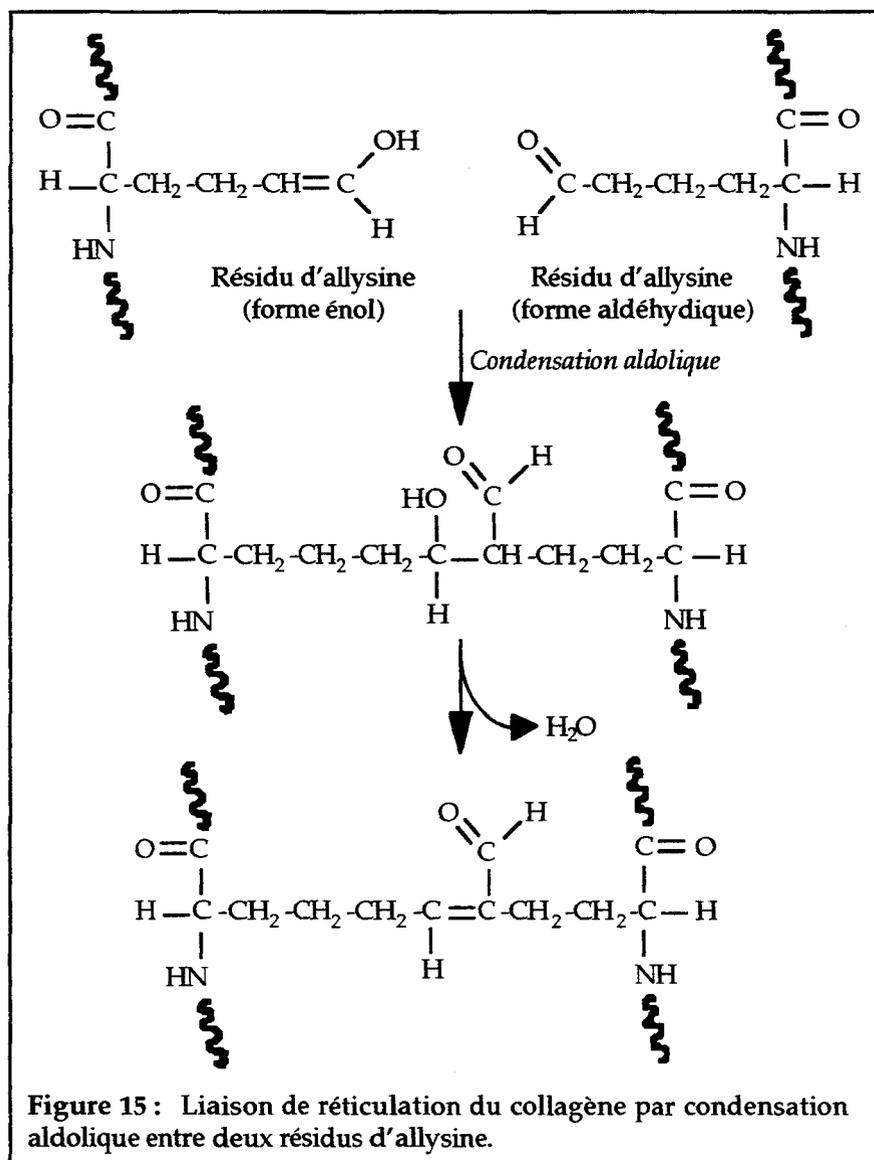
différences entre les molécules de collagènes proviennent des variations du nombre de triplets Gly-X-Y présents dans la séquence primaire de ces protéines, des structures et des positions des molécules glycaniques, ainsi que de la séquence des autres résidus présents en X et en Y. Enfin, plusieurs types de chaînes peuvent être présents au sein d'une famille

de molécules de collagène. Ainsi, la molécule de collagène de type I retrouvée dans l'os ($[\alpha_1(I)]_2 \alpha_2(I)$) est constituée de deux chaînes $\alpha_1(I)$ associées à une chaîne $\alpha_2(I)$. Cette forme de tropocollagène est essentiellement arrangée en triple hélice, à l'exception de courtes régions aux extrémités (figure 13 p.40). La molécule de collagène de type V est, elle aussi, constituée de deux chaînes α_1 hétérogènes et d'une chaîne α_2 , dont les séquences primaires diffèrent de celles de type I ($\alpha_1(V) \alpha_1(XI) \alpha_2(V)$). Des glucides (galactose ou glucose- α 1,2-galactose) sont fixés par covalence sur certains résidus de 5-hydroxylysine, si bien que le collagène de type I est en fait une glycoprotéine.

Ces molécules de tropocollagène sont de plus organisées en fibres (ou fibrilles) au sein de



la matrice extracellulaire osseuse. Leur résistance à la traction et leur rigidité sont dues d'une part aux liaisons hydrogènes entre hélices, et d'autre part à des liaisons covalentes autres que celles de cystine (communes à la plupart des protéines, mais totalement absentes dans le collagène). Des réticulations s'opèrent entre les chaînes latérales de certaines lysines ou hydroxylysines modifiées par l'intermédiaire de deux réactions enzymatiques : 1) la lysyl-oxydase qui transforme les groupes ϵ -aminés de résidus de



lysine ou d'hydroxylysine en allysine ou hydroxyallysine (figure 14 p.41) ; 2) une aldolase qui condense une allysine avec une lysine ou encore deux allysines entre elles (figure 15).

Les modes de synthèse, de sécrétion, puis d'assemblage des molécules de collagène de type I sont de loin les mieux étudiés des protéines de l'os [86]. Les gènes codant pour les chaînes α_1 (I) et α_2 (I) sont respectivement localisés sur les

chromosomes 7 et 17 chez l'homme. Ces chaînes α_1 et α_2 sont alors traduites puis passent dans la lumière du réticulum endoplasmique rugueux sous forme de précurseur du tropocollagène : le procollagène [64]. Les molécules pro- α_1 et pro- α_2 contiennent un excédent d'environ 100 résidus à leurs extrémités C et N terminales (les télépeptides).

Dans la lumière du réticulum endoplasmique, les résidus de proline et de lysine du procollagène sont alors transformés par modifications post-traductionnelles en résidus d'hydroxyproline et d'hydroxylysine, et des molécules de type glucidique sont ajoutées aux chaînes de procollagène sur les résidus d'hydroxylysine. Lorsque cette élongation est terminée, des ponts disulfures se forment entre les résidus de cystéine des peptides excédant des chaînes pro- α_1 et pro- α_2 (aux extrémités C-terminales), ce qui assure l'alignement indispensable des trois chaînes pro- α en triple hélice dans la lumière de l'appareil de Golgi. Après sécrétion dans la matrice extracellulaire, des procollagène peptidases élaguent les peptides supplémentaires des faisceaux de procollagène, et les molécules de tropocollagène s'assemblent spontanément en fibrilles (ou microfibrilles) après réticulation des triples hélices. Le rôle biologique éventuel de ces propeptides, après leur clivage, pourrait être de réguler la synthèse du collagène de type I par rétroaction [87]. D'autre part, des interactions entre une des chaînes de la triple hélice et la décorine pourraient être à l'origine de la formation et de l'arrangement des microfibrilles [88]. Les molécules de collagène alignées au sein des fibres ont également la particularité d'être séparées latéralement entre elles par un espace d'environ 45nm, et décalées d'environ un quart de leur longueur, soit 67nm. Cette distance équivaut à une séquence de 234 résidus d'acides aminés. Ces lacunes dans les fibres de collagène de type I jouent un rôle crucial dans la nucléation des cristaux au moment de la formation du tissu osseux, comme cela a été décrit précédemment. Enfin, le collagène de type I renferme 3 séquences Arg-Gly-Asp (RGD) connues pour être impliquées dans les mécanismes d'adhésion cellulaire [89].

Le collagène de type I est donc la molécule protéique la plus abondante de la matrice organique osseuse. De ce fait, elle est étudiée depuis de nombreuses années et reste la protéine ou glycoprotéine la plus connue de la matrice osseuse. Récemment, deux peptides collagéniques mineurs de 25 et 28kDa (Small Collagenous Apatite Binding Protein = SCAB) ont été décrits dans la matrice d'os foetal porcin et semblent exclus de

toute relation avec le collagène de type I [90]. Ces peptides pourraient alors constituer des composants collagéniques nouveaux de la matrice osseuse, bien qu'on n'ait pas encore pu les identifier dans un tissu osseux adulte.

C.II. LES PROTEOGLYCANNES

Les protéoglycannes sont des macromolécules constituées d'un noyau protéique sur lequel sont liées une ou plusieurs chaînes de glycosaminoglycannes (GAG) [91, 92]. Les glycosaminoglycannes sont des polymères linéaires d'unités disaccharidiques contenant d'une part une hexosamine pouvant être sulfatée (glucosamine ou galactosamine), et d'autre part un hexose sulfaté ou/et carboxylé (galactose, acide glucuronique ou iduronique). En plus des chaînes de glycosaminoglycannes, la plupart des noyaux protéiques portent des oligosaccharides O- ou/et N-liés, dont les structures sont similaires à celles présentes dans les glycoprotéines.

On distingue 4 classes de glycosaminoglycannes : l'acide hyaluronique, le chondroïtine/dermatane sulfate, le kératane sulfate et l'héparane sulfate (**figure 31** p.86). Le type de glycosaminoglycane porté par une protéine donnée peut varier selon la nature de la cellule étudiée.

C.II.1. Le biglycan et la décorine

Dans la matrice organique de l'os, on retrouve essentiellement des protéoglycannes de petite taille dont les mieux décrits à ce jour sont le biglycan (PG-I) et la décorine (PG-II) [93, 94, 95]. Ces deux protéoglycannes ne sont pas spécifiques de l'os puisqu'on les retrouve dans la plupart des matrices extracellulaires de l'organisme.

La décorine et le biglycan ont respectivement des masses moléculaires en gel de polyacrylamide en présence de SDS (SDS-PAGE) de 135 et 270kDa. Dans l'os, ils contiennent des chaînes latérales de chondroïtine 4-sulfate d'environ 40kDa, mais le biglycan porte deux chaînes contre une seule pour la décorine. Les masses moléculaires des parties protéiques de ces protéoglycannes avoisinent 38kDa, et ont la particularité d'être riches en résidus de leucine et d'asparagine (ou d'acide aspartique). Les clonages

moléculaires des noyaux protéiques ont révélé 55% d'homologie de séquence, suggérant que le biglycan et la décorine résulteraient de la duplication d'un même gène [96]. Les formes protéiques matures contiennent 330 résidus d'acides aminés pour la décorine et 332 pour le biglycan. On distingue les 4 domaines suivants : I) un domaine N-terminal de 23 résidus d'acides aminés. Ce premier domaine porte les chaînes latérales de glycosaminoglycannes branchées sur des résidus de sérine, en 4 pour la décorine et en 5 et 11 pour le biglycan ; II) un domaine de 28 résidus d'acides aminés dont 4 cystéines susceptibles de former 1 ou 2 ponts disulfures ; III) un domaine particulier de 232 résidus d'acides aminés contenant une série de 10 versions identiques d'un motif de 14 acides aminés riche en leucine (leucine Rich Repeat = LRR), séparées par des séquences moins conservées de 10 acides aminés environ. Ce domaine porte également des sites potentiels de N-glycosylation (3 asparagine pour la décorine, et 2 communes à la décorine pour le biglycan) ; IV) un domaine de 49 résidus d'acides aminés dont 2 cystéines susceptibles également de former un pont disulfure ; le domaine IV du biglycan renferme davantage de résidus hydrophobes que celui de la décorine.

Du point de vue synthétique, ces deux protéoglycannes sont fortement exprimés par les ostéoblastes puis sécrétés dans la matrice osseuse [97]. Après formation du noyau protéique, l'ensemble des réactions de glycosylation s'effectue dans le Golgi. Ces modifications post-traductionnelles débutent par l'addition d'un résidu de xylose sur une sérine du noyau protéique. Il existe des structures glycaniques communes d'ancrage des glycosaminoglycannes sur la chaîne protéique (description p.87).

La répartition de ces protéoglycannes varie avec l'âge, puisqu'ils représentent jusqu'à 10% des protéines non collagéniques dans l'os fœtal bovin [98], puis leur proportion diminue chez l'adulte. Ces protéoglycannes sont retrouvés à des taux similaires dans les os de différentes espèces animales, et leurs fonctions pourraient être communes à toutes les matrices osseuses. La décorine se lie aux fibrilles de collagène de type I par sa partie protéique (probablement par l'intermédiaire du domaine riche en leucine). Elle est

capable d'inhiber, *in vitro*, la formation de ces microfibrilles [99], si bien qu'on lui attribue un rôle potentiel de contrôle de la formation, de la stabilisation et/ou de la croissance des fibres de collagène [97]. Enfin, l'expression du biglycan au cours du développement du tissu osseux semble associée à la différenciation des ostéoblastes. En effet, alors que la décorine est retrouvée uniformément dans les ostéoblastes et les cellules progénitrices, le biglycan n'est exprimé qu'à des stades tardifs de différenciation des ostéoblastes [97].

C.II.2. Les autres protéoglycannes

Un protéoglycane de haut poids moléculaire de 600kDa (le versican) est retrouvé dans le mésenchyme interstitiel au cours de l'ostéogenèse précoce [100]. Ce protéoglycane à chondroïtine 4-sulfate serait, en fait, à l'origine du biglycan et de la décorine qui apparaissent plus tardivement au cours du développement de l'os.

A partir d'extraits osseux, *in vitro*, un quatrième protéoglycane à chondroïtine sulfate de petite taille, nommé CS-PG III, a été décrit exclusivement chez le porc et présente une masse moléculaire de 110kDa avec une partie protéique de 38kDa. Aucun rôle précis n'a encore été attribué à ce protéoglycane, mais il semble que celui-ci se lie préférentiellement à la phase minérale de la matrice osseuse [101].

Une glycoprotéine de 59kDa (la fibromoduline), de structure homologue à celle de la décorine et du biglycan, a également été retrouvée dans l'os [102]. Comme la décorine, la fibromoduline se lie aux microfibrilles de collagène et inhibe leur formation *in vitro* [103]. Toutefois, sa présence dans la matrice osseuse reste à l'état de trace. Par hydrolyse trypsique et précipitation au CaCl_2 d'une matrice osseuse bovine [104], Hashimoto a récemment isolé un fragment de 59kDa issu d'un nouveau protéoglycane. Ce dernier contiendrait une chaîne latérale de chondroïtine 4-sulfate et probablement de kératane sulfate. L'analyse de la séquence primaire du noyau protéique de ce fragment a démontré que ce protéoglycane n'appartenait pas à la famille des petits protéoglycannes. Il constituerait donc un nouvel élément de la matrice organique de l'os susceptible de participer au processus de formation de l'os.

Parallèlement, des études *in vitro* sur cultures de cellules osseuses ont révélé la présence d'un glycosaminoglycane de type héparane sulfate synthétisé par ces cellules osseuses et susceptible de se lier à des facteurs de croissance en provenance de la circulation [105]. De même, un glycosaminoglycane non sulfaté de type hyaluronane est synthétisée par des ostéoblastes en culture [100], mais son rôle n'est pas clairement défini. Toutefois, par analogie avec d'autres tissus, ce glycosaminoglycane serait impliqué dans la prolifération et la différenciation cellulaire.

Enfin, la sialoprotéine osseuse de lapin (détaillée ultérieurement) porte une chaîne de kératane sulfate ; cette glycoprotéine unique appartient donc, dans cette espèce, à la famille des protéoglycannes [106].

Les protéoglycannes sont globalement des glycoprotéines non négligeables de la matrice organique du tissu osseux. La décorine et le biglycan sont les protéoglycannes majeurs les mieux étudiés de la matrice. Bien que leur rôle ne soit pas encore clairement établi, ce sont des glycoprotéines de structure qui doivent intervenir dans le processus de formation de la matrice organique osseuse.

C.III. LES γ -CARBOXYGLUTAMIQUE PROTEINES (GLA-FROTEINES)

L'acide gamma-carboxyglutamique (γ Glu ou Gla) est le résultat d'une modification post-traductionnelle vitamine K-dépendante d'un acide glutamique. Cette réaction de γ -carboxylation correspond à la fixation d'une molécule de CO_2 sur le carbone terminal de la chaîne latérale du glutamate, par action d'une carboxylase dont la vitamine K est un cofacteur. La forme active de la vitamine K lors de la carboxylation des protéines est une hydroquinone (**figure 16 p.48**) [107]. Les acides γ -carboxyglutamiques ont initialement été découverts lors de l'étude des différents facteurs de la coagulation vitamine K-dépendants. En particulier, la prothrombine (facteur II), forme inactive de la thrombine qui contient 10 résidus d'acide gamma-carboxyglutamique, reste la protéine la plus étudiée des protéines à carboxylation vitamine K-dépendantes [108]. En raison de son

affinité pour les ions calcium, le γ Glu a rapidement été recherché dans les tissus minéralisés et plus particulièrement dans l'os. Les deux protéines majeures de la matrice organique de l'os à résidu d'acide γ -carboxyglutamique sont l'ostéocalcine et la Gla-protéine matricielle.

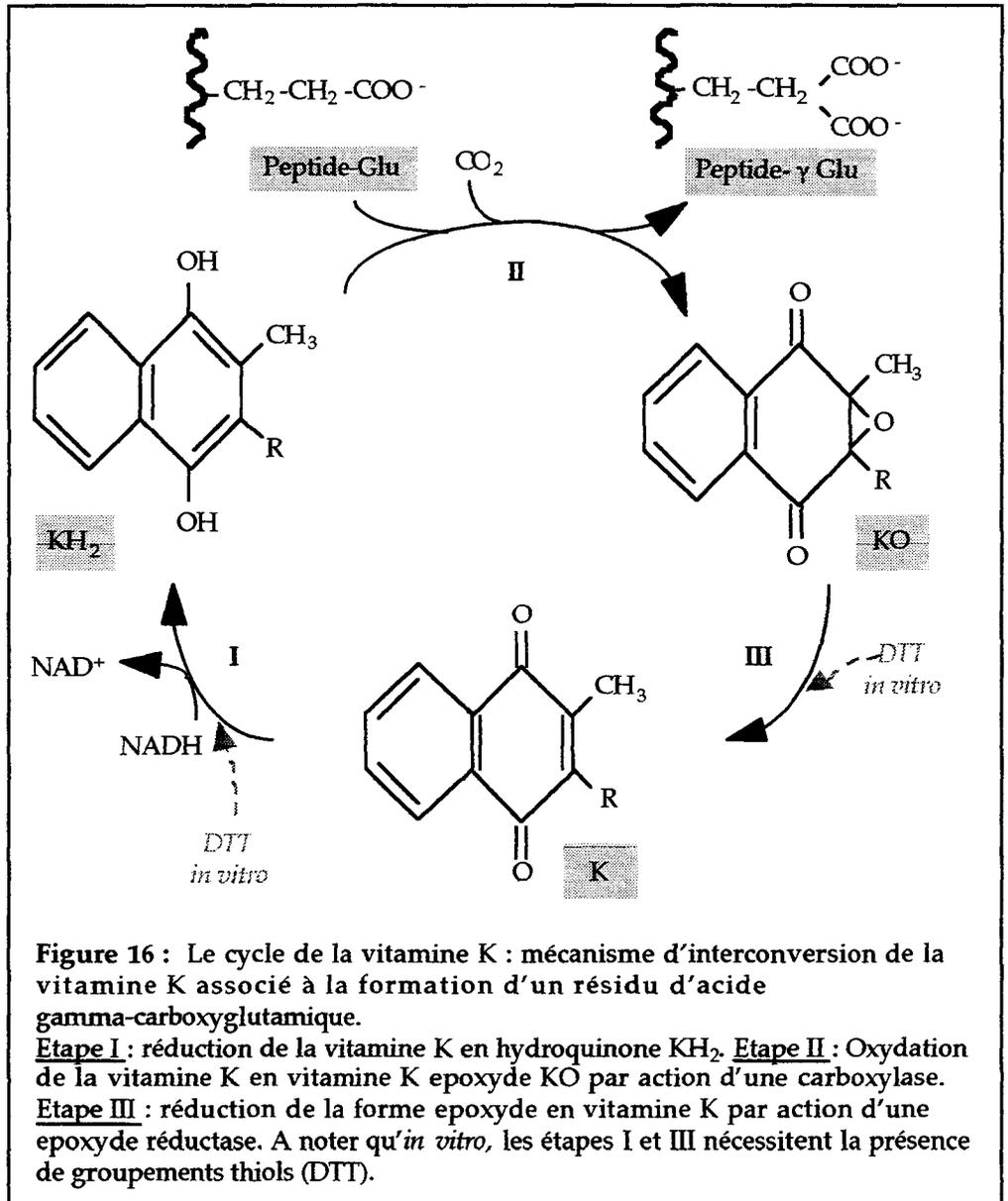


Figure 16 : Le cycle de la vitamine K : mécanisme d'interconversion de la vitamine K associé à la formation d'un résidu d'acide gamma-carboxyglutamique.

Etape I : réduction de la vitamine K en hydroquinone KH_2 . **Etape II :** Oxydation de la vitamine K en vitamine K epoxyde KO par action d'une carboxylase.

Etape III : réduction de la forme epoxyde en vitamine K par action d'une epoxyde réductase. A noter qu'*in vitro*, les étapes I et III nécessitent la présence de groupements thiols (DTT).

C.III.1. L'ostéocalcine

On la nomme également Gla-protéine osseuse (BGP). Cette protéine est la plus abondante des protéines non collagéniques de la matrice extracellulaire (1 à 20% des protéines matricielles osseuses selon l'âge et l'espèce) et représente 0,5 à 1% des protéines totales de l'os [109]. L'ostéocalcine fait ainsi partie des 10 protéines les plus abondantes du corps humain. C'est une protéine acide ($\text{pI} = 4.0$) de faible poids moléculaire (proche de 6kDa), constituée d'une chaîne unique de 46 à 50 résidus d'acides aminés selon l'espèce. Elle a pour la première fois été isolée à partir d'une matrice osseuse de poulet par le groupe d'Hauschka [110], puis dans l'os bovin par Price [111]. La séquence en acides aminés

de l'ostéocalcine a été déterminée chez plusieurs espèces dont l'homme [110].

L'ostéocalcine est hautement conservée, en particulier en ce qui concerne les trois résidus d'acide γ -carboxyglutamique en positions 17, 21 et 24, et le pont disulfure 23-29 (figure 17).

	1	10	20	30	40	Nombre de résidus
Singe	YLYQWLGAPAPYPDPLEPKREVCELNPDCDELA				DHIGFQEAYRRFYGPV	49
Lapin	E-I?GQ				QV-L-D-Q	49
Homme		V	R			49
Bœuf	DH					49
Porc	DHG		R		IA	49
Mouton	DPG		R			49
Chèvre	DPG					49
Chat	APG		I		D T	49
Kangourou	T F		Q N		S TA	49
Rat	NNG		H	N	D K I TTV	50
Souris		SV S	T Q	A	S QY LKT K I ITI	46
Poulet	H AQDSGV G	N AQ	S	Q		49
Espadon	ATR GDLT LQ SL		VS M TA IVA IAY IQF			47
Acides aminés conservés*		P P P P	RE	CEL P	CDEL D G AY R YG	
Acides aminés conservés		P	E RE	CEL	CDE D G AY YG	

Figure 17 : Structures primaires d'ostéocalcines d'espèces variées [110 pour références] ; les résidus identiques à ceux du singe sont indiqués par (-) et les délétions par un espace blanc ; les résidus Gla communs sont en position 17, 21 et 24 ; un pont disulfure relie les résidus de cystéine 23 et 29 ; * signifie résidus communs à toutes les espèces excepté l'espadon.

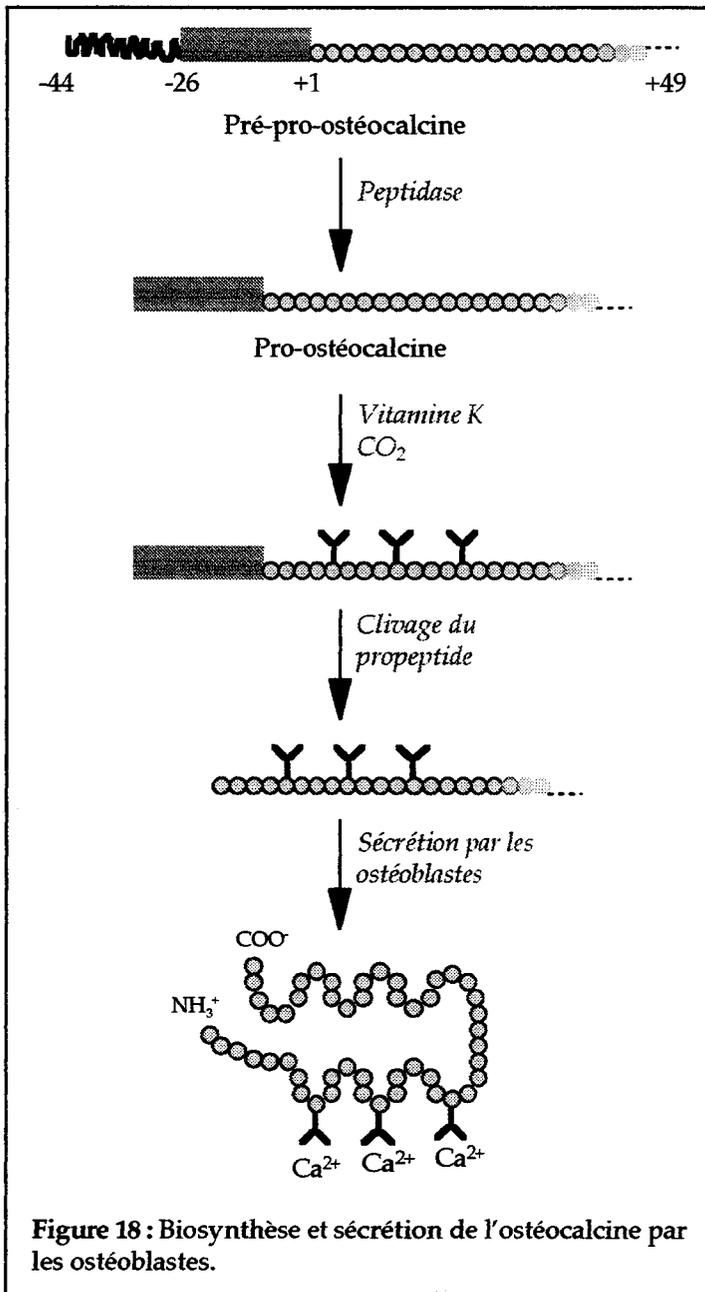
Les analyses conformationnelles par dichroïsme circulaire [112], spectroscopie en ultraviolet et résonance magnétique nucléaire en solution [113, 114] de l'ostéocalcine de poulet ont permis de déterminer la présence de deux domaines antiparallèles alpha-hélicoidaux (la Gla-hélice en 16-25 et l'hélice Asp-Glu en 30-41), reliés entre-eux par un peptide contenant un coude β (en 26-29), et stabilisés par un pont disulfure unique 23-29.

L'arrangement structural de la première hélice α est dépendant des ions calcium [115], puisqu'en solution sans calcium, l'ostéocalcine est particulièrement flexible et adopte à une conformation aléatoire [113]. Ce domaine hélicoidal renferme les trois résidus de γ Glu alignés, cet arrangement semblant essentiel à l'interaction de la protéine avec le

réseau d'hydroxyapatite. L'affinité de l'ostéocalcine pour l'hydroxyapatite est en effet largement diminuée par décarboxylation [112, 116, 117], ou par utilisation d'un inhibiteur de la carboxylation comme la warfarine (métabolite antagoniste de la vitamine K) [109]. De plus, lorsque la protéine est adsorbée sur le réseau d'hydroxyapatite, les résidus de γ Glu sont parfaitement protégés contre une décarboxylation par chauffage [117]. En solution, l'ostéocalcine fixe 2 à 3 moles d'ions calcium par mole de protéine avec une constante de dissociation comprise entre 0,8 et 3mM [115]. Elle ne se fixe pas dans les mêmes conditions aux anions phosphate. La seconde hélice est quant à elle antiparallèle à la première. Enfin, on note à l'extrémité C-terminale une conformation en feuillet β des acides aminés 42 à 48, probablement à l'origine de l'interaction spécifique des monocytes avec l'ostéocalcine *in vitro* [118].

L'ostéocalcine apparaît comme un produit de synthèse spécifique des ostéoblastes [119]. Le gène humain de l'ostéocalcine a été localisé sur le chromosome 1 [120]. Une pré-ostéocalcine de 125 acides aminés est synthétisée dans un premier temps et inclut un peptide signal de 26 résidus. Après action d'une peptidase, la pro-ostéocalcine libérée subit différentes modifications post-traductionnelles dont la γ -carboxylation vitamine K-dépendante de certains résidus d'acide glutamique. Un nouveau clivage protéique libère la forme mature de l'ostéocalcine (environ 6kDa) qui est sécrétée par les ostéoblastes. En fait, il se pourrait que la séquence du propeptide libéré soit un signal de reconnaissance par la carboxylase du cycle d'action de la vitamine K [121]. En effet, l'extrémité N-terminale de ce propeptide présente une séquence de 9 acides aminés commune à l'ensemble des propeptides des ostéocalcines isolées d'espèces variées (**figure 18** p.51).

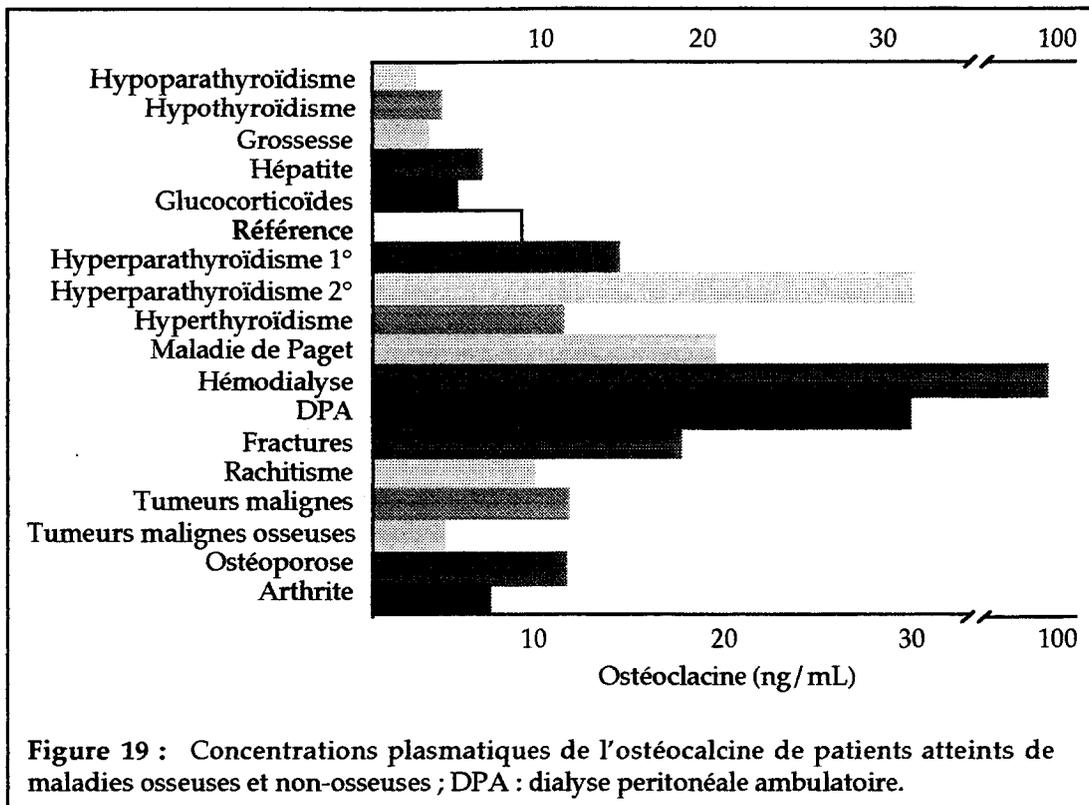
La biosynthèse de l'ostéocalcine implique en fait l'action de trois vitamines : 1) la vitamine K pour la formation des résidus γ Glu ; 2) la vitamine C pour l'hydroxylation du résidu de proline (en position 9) en hydroxyproline ; 3) la vitamine D pour la stimulation de la production de la protéine ; en effet, la 1,25 (OH)₂ vitamine D₃ contrôle directement



la transcription du gène de l'ostéocalcine, sur le promoteur du gène qui présente une séquence dite « élément de réponse à la vitamine D » [122-126]. L'ostéocalcine étant spécifique du métabolisme des ostéoblastes, le contrôle de sa synthèse rejoint la régulation du processus de formation osseuse décrit précédemment, qui implique de nombreux facteurs hormonaux et locaux [127].

L'ostéocalcine est considérée comme une protéine spécifique de l'os, et plus particulièrement des ostéoblastes et ostéocytes. Aucun ARNm n'a pu être détecté dans des préparations de foie (site actif de γ -carboxylation des facteurs de coagulation vitamine K-

dépendants), de langue, d'intestin, de cœur, de rein, de cerveau, de peau, ou même de rate. Cependant, une fraction de l'ostéocalcine produite n'est pas incorporée à la matrice osseuse, mais s'échappe dans la circulation sanguine [128]. Diverses études ont montré que les valeurs sériques de l'ostéocalcine sont en relation avec l'intensité du remodelage osseux, et, en particulier, avec la formation de la matrice extracellulaire de l'os. Ainsi, une variation de la concentration plasmatique de l'ostéocalcine est généralement le reflet de désordres pathologiques de l'os d'origines diverses (**figure 19** p.52) [129].

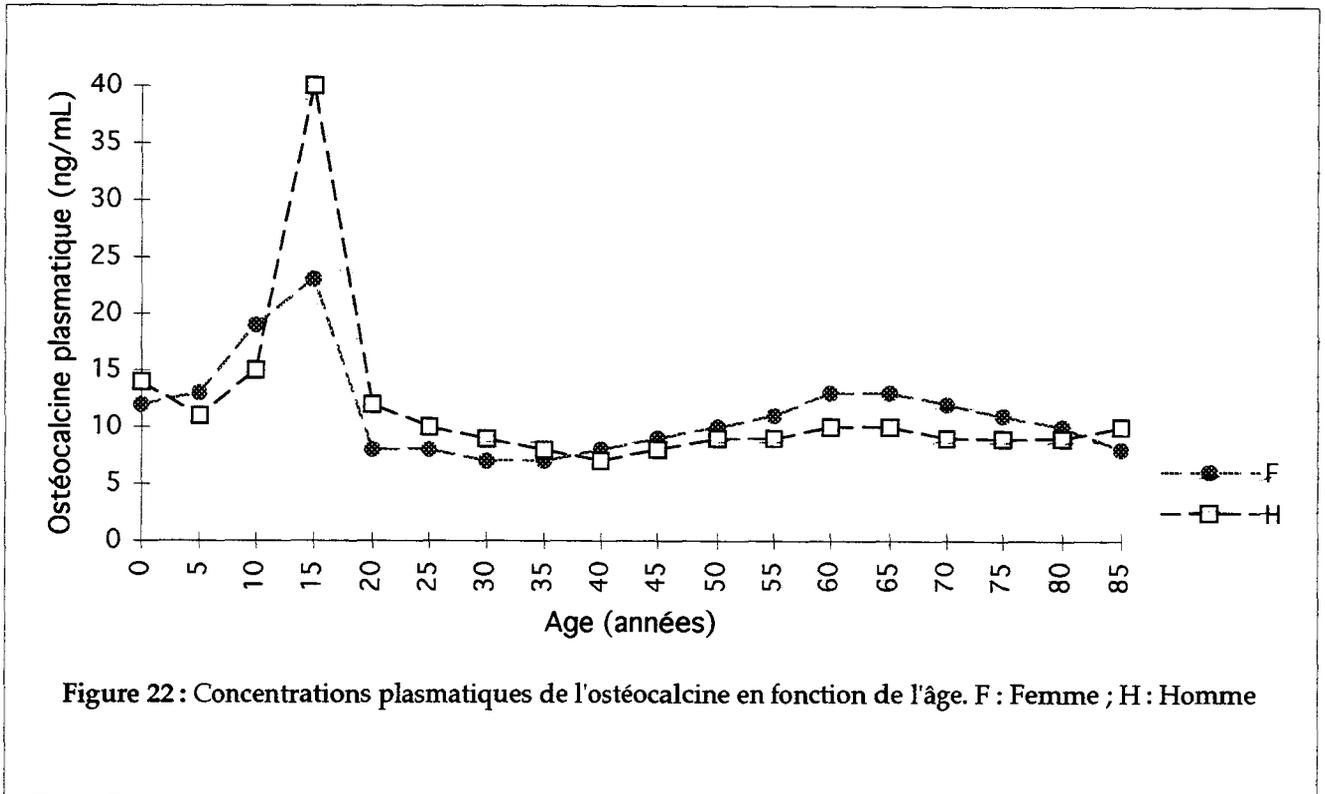


On pense que l'ostéocalcine plasmatique provient d'une néosynthèse d'origine osseuse plutôt que d'une résorption ou d'un relargage de la protéine [128], même si le squelette constitue un réservoir très important d'ostéocalcine (sa concentration y est 10^4 à 10^5 fois plus élevée que dans le sang).

Enfin, la concentration normale en ostéocalcine est fonction de l'âge. Les concentrations sont plus élevées chez le nouveau-né, l'enfant et l'adolescent que chez l'adulte [130, 131]. A la naissance, les taux sont les plus élevés (40 à 60mg/mL), demeurent importants jusqu'à 12 mois puis déclinent rapidement (10 à 25mg/mL), et restent constants jusqu'à la puberté. L'effet hormonal à cet âge est variable selon le sexe, mais se traduit systématiquement par une augmentation brutale de la concentration en ostéocalcine. Chez l'adulte, les taux sont peu élevés et stables (environ 5mg/mL) [129]. On observe des variations uniquement chez la femme enceinte ou ménopausée (figure 20 p.53).

La fonction précise de l'ostéocalcine comme composant de la matrice osseuse n'est toujours pas clairement définie et reste un domaine de spéculations. L'analyse structurale de l'ostéocalcine montre un alignement caractéristique des résidus de γ Glu favorable à

l'adsorption sur l'hydroxyapatite. De plus, le domaine C-terminal en feuillet β (et plus particulièrement le pentapeptide Phe-Tyr-Gly-Pro-Val) pourrait être le locus essentiel à l'interaction de la protéine avec des récepteurs de cellules voisines [118, 132].



Par son affinité avec les ions Ca^{2+} , l'ostéocalcine pourrait inhiber ou stimuler les phénomènes de nucléation ou de précipitation et pourrait mobiliser les ions Ca^{2+} accessibles en surface du cristal formé ou en formation [133]. Des études récentes ont montré que l'ostéocalcine interagit avec des phospholipides vésiculaires [134]. Or il est maintenant bien établi que le complexe Ca^{2+} /phospholipide est capable d'initier *in vitro* la cristallisation minérale, à partir de solutions saturées en calcium et en phosphate. Cette propriété conférée à l'ostéocalcine suggère en fait que, par sa liaison aux phospholipides, elle influencerait l'initiation de la minéralisation et stabiliserait la structure osseuse. D'autre part, la résorption osseuse implique l'activation d'ostéoclastes présents à la surface osseuse, ainsi que la stimulation et la fusion de cellules précurseurs des ostéoclastes (supposées être des monocytes ou des macrophages). Effectivement, les monocytes peuvent être mobilisés à la surface de l'os par différentes protéines de la matrice, telles

que le collagène de type I, l' α_2 HS glycoprotéine et l'ostéocalcine [27, 132, 135]. Parallèlement, des expériences ont montré que des implants sous-cutanés de particules osseuses provenant de rats traités par la warfarine (inhibiteur de la gamma-carboxylation) ne sont pas dégradés aussi activement que ceux provenant de rats témoins [136]. Même si ces résultats sont controversés [137], l'ostéocalcine pourrait servir de signal au recrutement et à la différenciation des cellules impliquées dans la résorption osseuse. De par son abondance dans l'organisme, l'ostéocalcine reste une protéine largement étudiée. Toutefois, les rôles qu'on lui attribue restent incertains et font toujours l'objet de nombreuses recherches. Enfin, étant donné sa présence relative dans la circulation sanguine, cette protéine constitue un marqueur biologique fiable lors de l'exploration de désordres métaboliques du tissu osseux.

C.III.2. La Gla Protéine matricielle (MGP)

Plus récemment, une protéine contenant des résidus d'acide gamma-carboxyglutamique a été isolée de la matrice osseuse : la Gla-protéine matricielle (MGP). Son nom provient de son adhésion avec la phase organique de l'os et du cartilage [138-140]. La MGP bovine contient 79 résidus d'acides aminés dont 5 γ Glu en positions 2, 37, 41, 48 et 52, pour un poids moléculaire de 19kDa environ. Elle contient un pont disulfure et il semble que le résidu d'acide glutamique en position 2 ne soit que partiellement carboxylé (80%). Par opposition à l'ostéocalcine, la MGP ne contient pas de domaine hydrophobe, et pourtant, seule la MGP est insoluble dans l'eau en absence d'agent dénaturant. Le séquençage de l'ADNc de la MGP de rat [141], de bovin et d'humain [142] prédisent une taille de 84 résidus d'acides aminés pour la protéine mature, soit 5 résidus supplémentaires à l'extrémité C-terminale. Ce pentapeptide (Arg-Arg-Gly-Ala-Lys) perdu à l'extrémité C-terminale est commun aux trois espèces et, par analogie avec le rôle chimio-attractif de l'ostéocalcine, ce peptide de la MGP aurait une fonction biologique importante. Parallèlement, le pro-polypeptide humain de 103 résidus (12,5kDa) est

respectivement à 84,5 et 81,6% homologue aux précurseurs polypeptidiques de bœuf et de rat. Il existe une homologie importante entre la séquence de l'ostéocalcine et celle de la partie carboxy-terminale de la Gla-protéine matricielle, ce qui suggère qu'elles seraient issues d'une duplication de gène. La Gla-protéine matricielle n'a aucune fonction biologique connue, mais elle présente de fortes interactions avec la matrice organique et ses constituants. Elle est également liée à l'hydroxyapatite.

Au cours du développement de l'os, la MGP apparaît avant l'initiation de la minéralisation. Elle est exprimée beaucoup plus tôt que l'ostéocalcine, ce qui suggère des modes de régulation différents [143]. A la naissance, la MGP représente 130% du taux chez le rat adulte, alors que l'ostéocalcine ne constitue que 1 à 2%. La concentration finale de la Gla-protéine matricielle atteint chez le rat adulte 0,4mg/g de tissu, soit approximativement 10% du taux de l'ostéocalcine dans l'os. L'emploi d'inhibiteur de la gamma-carboxylation (de type warfarine) sur des rats ne provoque pas d'effet notable sur la MGP. Dans ce modèle, la MGP est relativement résistante aux effets de la warfarine, probablement en raison de son faible taux de renouvellement osseux [138, 144]. La biosynthèse ostéoblastique de la MGP est, comme l'ostéocalcine, sensible à la 1,25 (OH)₂ vitamine D₃. Enfin, les explorations d'ARNm de la MGP dans de nombreux tissus ont révélé des taux d'ARNm plus importants dans la langue, le rein, la rate et le foie que dans l'os. Ces résultats sont en désaccord avec l'accumulation de la MGP dans les tissus mous, par comparaison avec les concentrations de la protéine (50 fois plus élevées) dans l'os et le cartilage [145].

C.III.3. La Protéine S

Les deux Gla-protéines majeures de la matrice organique osseuse (ostéocalcine et MGP) ne rendent pas compte de la totalité des résidus d'acide γ -carboxyglutamique présents dans la matrice de l'os, si bien que d'autres Gla-protéines doivent s'y trouver. C'est le cas d'un facteur de coagulation, la protéine S, qui a été mis en évidence dans la

matrice osseuse, et qui est synthétisé par des ostéoblastes humains en culture [146]. La forme osseuse semble être identique à la forme plasmatique. Sa masse moléculaire est de 75kDa et la protéine S renferme 11 résidus d'acide γ -carboxyglutamique. Certains cas d'ostéopénie (perte de la densité minérale osseuse) sont associés à une déficience en protéine S dont l'origine tissulaire pourrait être l'os. La sécrétion normale de la protéine S par les ostéoblastes pourrait donc être essentielle au maintien de la masse osseuse.

C.IV. LES PHOSPHO/SIALOPROTEINES

On retrouve dans la matrice organique de l'os une forte concentration de résidus d'acide sialique. Les sialoprotéines représentent approximativement 0,2% du poids sec d'un extrait osseux [147]. Les premières références en rapport avec les protéines acides sont celles de Hering et Kent en 1963, qui décrivaient une sialoprotéine capable de se lier aux ions Ca^{2+} [148, 149]. Depuis 15 ans, deux protéines non collagéniques enrichies en acides sialiques ont été isolées de la matrice de l'os et correspondent à la sialoprotéine osseuse (*bone sialoprotein II*, BSP) et à l'ostéopontine (*bone sialoprotein I*, 44kDa phosphoprotein, 2 ar). Ces deux sialoprotéines ont des caractéristiques communes, comme la présence d'une séquence RGD (tripeptide essentiel à la reconnaissance par certains récepteurs de la surface cellulaire de type intégrine [150]) et la présence de résidus de phosphosérine et de phosphothréonine. Les dosages du phosphore organique contenu dans l'os de poulet ont montré que les résidus de phosphore ont pour origine : 1) les protéines non-collagéniques (80%), sous forme de résidus de phosphosérine ou de phosphothréonine ; 2) le collagène (20%), jamais sous les formes précédentes mais probablement sous la forme de phosphoglutamate [151]. Pour ces raisons, ces deux sialoprotéines sont également des phosphoprotéines. Une troisième sialoprotéine phosphorylée a récemment été identifiée dans l'os de rat : la BAG-75 (*bone acidic glycoprotein* de 75kDa) dont la séquence N-terminale se distingue de celle de l'ostéopontine et de la BSP [152]. D'autre part, l'ostéonectine, bien qu'étant non spécifique de l'os, est une protéine sialylée (3%) et

phosphorylée (0,5%) qui appartient donc à la famille des phospho/sialoprotéines de la matrice organique osseuse.

Enfin, en marge de ces phosphoprotéines majeures de la matrice organique de l'os, de nombreux peptides et protéines ont été décrits et isolés à partir d'os de poulet [153, 154]. Le détail de ces protéines ne sera pas exposé mais, ces protéines, comme toutes les phosphoprotéines, renferment des résidus de phosphosérine et de phosphothréonine, sont synthétisées et sécrétées par les ostéoblastes, et s'accumulent dans la matrice organique de l'os aux sites de minéralisation de l'ostéoïde.

Etant donné leurs affinités pour l'hydroxyapatite et le collagène de type I, ainsi que leur abondance dans l'os, les phosphoprotéines semblent essentielles à l'initiation et au contrôle de la minéralisation de l'ostéoïde.

C.IV.1. La sialoprotéine osseuse (BSP)

Cette sialoprotéine, également phosphoprotéine, est une des premières protéines de la matrice organique de l'os à avoir été étudiée en détail. Herring et Kent furent les premiers à décrire une sialoprotéine de 23kDa chez l'homme [149], contenant 20% d'acide sialique. Vingt ans plus tard, en 1983, le groupe de Fisher isole une sialoprotéine à partir d'os foetal bovin, de masse moléculaire comprise entre 70 et 80kDa en SDS-PAGE [155]. Après digestion tryptique, ces derniers ont obtenu un fragment de 25kDa environ, correspondant en fait à la protéine de 23kDa décrite par Herring et Kent en 1963, qui s'accumule dans la phase extracellulaire de l'os adulte.

La sialoprotéine osseuse est donc une glycoprotéine acide, phosphorylée et sulfatée [94, 155-158]. Le gène de la BSP humaine est localisé sur le chromosome 4 [159]. La BSP humaine a une masse moléculaire de 65-75kDa pour une chaîne polypeptidique immature de 34,98kDa (pré-protéine de 317 acides aminés) puis de 33,35kDa avant glycosylation (masses moléculaires déduites de l'ADNc). La masse du polypeptide n'excédant pas 50%, cette sialoprotéine est donc une protéine hautement glycosylée. Les rares études de la glycosylation de la protéine décrivent la BSP comme une protéine de

type mucinique, puisque les structures glycaniques prédites sont celles retrouvées classiquement dans les mucines (oligosaccharides O-liés à la partie protéique). On dénombre 3 ou 4 sites potentiels de N-glycosylation selon l'espèce (sur des résidus d'asparagine) et une trentaine de sites de O-glycosylation (sur des résidus de sérine et thréonine) [160]. La BSP est riche en acide sialique (12 à 17%) et contient des résidus de glucosamine, de galactosamine, de galactose et de mannose.

Il semble donc que l'on retrouve les deux classes de glycoconjugués sur la BSP : un premier lourd fragment oligosaccharidique riche en acide sialique et sulfaté serait N-lié à la protéine (les autres sites de N-glycosylation pourraient également être substitués) [161]; de nombreux autres fragments plus petits, avec ou sans acide sialique et groupement

sulfate seraient O-liés à la

protéine. On note dans la

séquence primaire de la BSP

humaine 45 résidus de sérine

ou de thréonine dont 76%

sont glycosylés. Globalement,

on retrouve donc un acide

aminé glycosylé sur sept et il

semble que les résidus non

glycosylés soient

phosphorylés. Quelle que soit

l'origine de la protéine, la

fraction glycanique

représente 50% du poids sec.

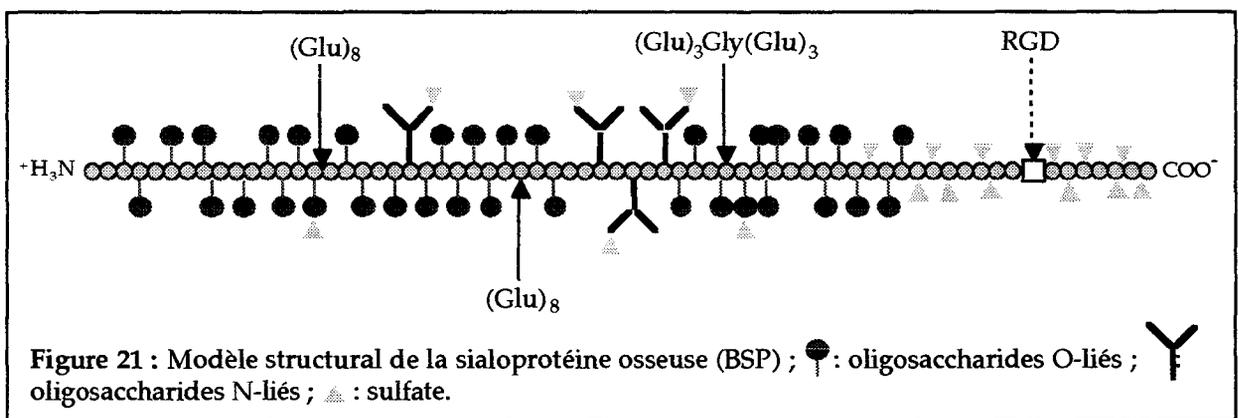
Toutefois, la composition en

résidus d'acides aminés varie

	Bovin	Humain	Rat	Poulet
<i>Acides aminés /1000</i>				
Asp/Asn	154	117	118	132
Thr	82	83	79	36
Ser	81	59	69	92
Glu/Gln	190	274	233	265
Pro	48	75	43	53
Gly	118	87	108	102
Ala	50	29	79	91
Cys	ND	ND	ND	ND
Val	32	37	39	40
Met	5	ND	6	0
Ile	32	21	6	16
Leu	43	26	33	31
Tyr	63	53	75	15
Phe	24	30	23	7
His	18	19	13	8
Lys	39	55	42	31
Arg	28	31	29	53
OH-Pro	ND	0	ND	ND
OH-Lys	ND	0	ND	ND
<i>% poids sec</i>				
Glucosamine	7	ND	ND	ND
Galactosamine	6	ND	ND	ND
Neu Ac.	12	17	ND	ND
Mannose	traces	ND	ND	ND
Références	[155]	[94]	[156]	[188]

Tableau 4 : Résidus d'acides aminés / 1000 des sialoprotéines osseuses (BSP) isolées d'espèces différentes

sensiblement, mais les résidus majeurs sont systématiquement l'acide glutamique, la glycine et l'acide aspartique comme l'indique le **tableau 4** (p.58). On observe plusieurs domaines structuraux conservés entre les espèces qui pourraient être des domaines fonctionnels. Parmi ces domaines remarquables, sont présentes trois régions riches en acides glutamiques (polyGlu, jusqu'à 10 résidus consécutifs) dont les études récentes par Hunter [162] ont précisé le rôle essentiel de ces séquences lors du processus de nucléation du réseau d'hydroxyapatite, des régions riches en tyrosine susceptibles d'être des sites de sulfatation (sulfo-tyrosine), une séquence Arg-Gly-Asp (RGD), différents sites de phosphorylation et les sites de N et O-glycosylation évoqués précédemment (**figure 21**).



Contrairement à l'ostéopontine (décrite ci-après) qui présente une large distribution, la sialoprotéine osseuse est spécifique de l'os, à l'exception près de la dentine et du ciment [163, 164]. Différentes études *in vitro* indiquent qu'elle serait essentiellement liée à l'hydroxyapatite, mais une partie serait intégrée dans la matrice collagénique [101, 160, 165].

L'expression de la sialoprotéine est restreinte aux ostéoblastes différenciés [166] et aux ostéocytes jeunes [164, 167]. Précisément, la BSP, associée à la phosphatase alcaline, est un marqueur de la différenciation ostéogénique des pré-ostéoblastes en ostéoblastes [168, 169]. Toutefois, l'ARNm de la BSP a pu être détecté dans les ostéoclastes [169] et Masi a récemment décrit sa biosynthèse dans des cellules en culture de type ostéoclaste [170]. Enfin, elle semble s'accumuler au niveau des aires de formation osseuse, dans l'ostéoïde avant minéralisation [165, 171]. L'ensemble de ces observations suggère donc que cette

protéine pourrait jouer un rôle spécifique dans le processus d'initiation de la minéralisation de la matrice organique osseuse.

Sa localisation intracellulaire (dans l'ostéoblaste) est restreinte à l'appareil de Golgi et aux vésicules de sécrétion post-Golgi [172]. Sa biosynthèse est stimulée par la dexaméthasone *in vitro* (analogue des glucocorticoïdes) [173], alors que la 1,25 dihydroxyvitamine D₃ la diminue [174]. Nous verrons que ces deux agents hormonaux ont des effets antagonistes sur la production de l'ostéopontine. En outre, la PTH stimule directement l'expression du gène de la BSP dans les ostéoblastes [175].

La séquence d'adhésion cellulaire de la sialoprotéine osseuse est en fait un pentapeptide GRGDN localisé à l'extrémité C-terminale de la protéine. Cette séquence est flanquée par deux régions riches en tyrosine sulfate. Or, le rôle de cette modification post-traductionnelle tardive par la tyrosyl-protéine sulfotransférase du trans-Golgi-network (TGN) semble être essentiel à la sécrétion et à la fonction de la BSP [158]. Ainsi, la liaison de la BSP sur ses récepteurs membranaires pourrait dépendre de la sulfatation des résidus de tyrosine [176]. Chez le poulet, la BSP possède deux motifs RGD supplémentaires et un site d'attachement cellulaire RGD démasqué lors du clivage de la protéine [177]. Ces propriétés d'adhésion cellulaire de la BSP ont été mises en évidence sur un grand nombre de cellules dont les ostéoblastes et les ostéoclastes. Le récepteur cellulaire de la sialoprotéine osseuse a été isolé *in vitro* sur des cellules apparentées aux ostéoblastes [23] et semble d'un point de vue structural identique au récepteur de la vitronectine $\alpha_v\beta_3$ [156]. Ce récepteur a déjà été localisé à la surface membranaire des ostéoclastes dont il permet l'adhésion aux protéines de la matrice contenant ce tripeptide RGD. Il semble en fait que l'attachement des ostéoclastes à la matrice osseuse lors de l'initiation des processus de résorption dépende de l'interaction des ostéoclastes avec la BSP et l'ostéopontine, par l'intermédiaire du récepteur de la vitronectine [178]. De plus, la phosphatase acide tartrate résistante spécifique des ostéoclastes pourrait réguler, en les

déphosphorylant, les propriétés adhésives des sialoprotéines sur les ostéoclastes [29]. L'ensemble de ces observations suggère donc que la BSP pourrait être impliquée dans les processus d'ancrage des cellules osseuses à la matrice, et pourrait, de ce fait, jouer un rôle dans les mécanismes locaux du remodelage. Parallèlement, la sialoprotéine osseuse est une glycoprotéine acide (riche en résidus d'acide glutamique, d'acide aspartique, en phosphate et en sulfate), ce qui lui confère une forte affinité pour l'hydroxyapatite. Ces séquences répétées d'acide glutamique peuvent en outre induire la formation des cristaux d'hydroxyapatite [76, 179]. Puisqu'elle peut se lier à la fois à l'hydroxyapatite et au collagène [180, 181], cette protéine pourrait être l'agent de nucléation déclenchant la formation des cristaux d'hydroxyapatite à la surface des microfibrilles de collagène [101]. Dernièrement des études ont décrit une forte affinité de la sialoprotéine osseuse pour des souches de *Staphylococcus aureus* isolées exclusivement de patients atteints d'infections osseuses (ostéomyélites). Ainsi, la BSP pourrait intervenir dans le mécanisme d'adhésion du Staphylocoque à la surface du tissu osseux lors de ce type d'infection [182].

La sialoprotéine osseuse est donc la phosphoprotéine majeure de la matrice osseuse. Etant spécifique de l'os et plus particulièrement des ostéoblastes matures, elle constitue un excellent marqueur métabolique de ces cellules pour l'exploration de certaines pathologies osseuses. De nombreux rôles biologiques lui sont suspectés et pour ces raisons la BSP reste une glycoprotéine largement étudiée. Enfin, c'est une protéine relativement

bien conservée,			Humaine	Rat	Poulet	Porc
retrouvée dans de		Séquence RGD	1	1	5	1
		Séquence PolyGlu	3	3	3	2
nombreuses espèces et		Tyrosine sulfate	++	++	++	+
		Site de N-glycosylation	4	3	1	
présentant des		% d'homologie avec la BSP humaine	100	80	39	74
structures communes						

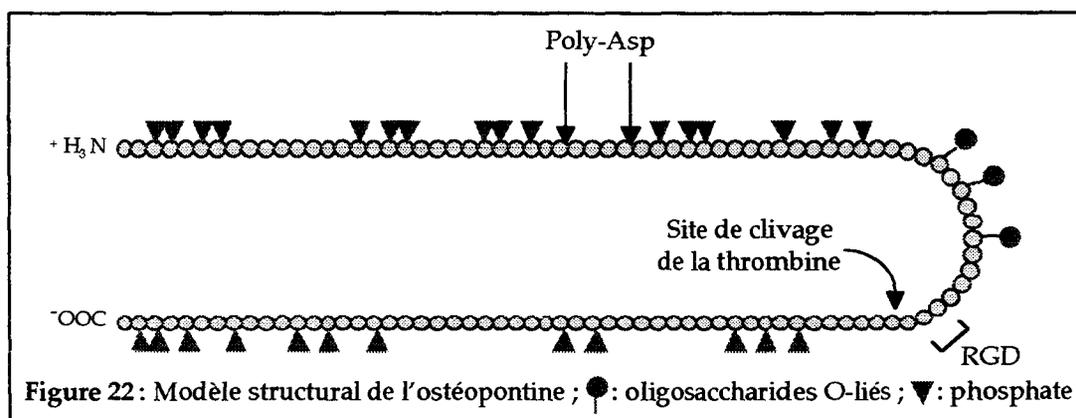
qui la caractérisent **Tableau 5 : Comparaison des structures de sialoprotéines osseuses de différentes espèces**

(tableau 5).

C.IV.2. L'ostéopontine

Comme la sialoprotéine osseuse, l'ostéopontine (étymologiquement « pont-osseux ») est une glyco/phosphoprotéine acide ($pI = 5$) de la matrice organique de l'os [183 pour revue]. Elle fut initialement caractérisée et isolée dans la matrice minérale osseuse bovine [147, 184], puis chez le rat [185], l'homme [94], la souris [186], le porc [187] et le poulet [188, 189]. Les masses moléculaires des ostéopontines décrites sont comprises entre 65 et 80kDa. Alors qu'on admettait l'origine du fragment acide de Herring de 23kDa à la BSP chez le bovin [149, 155], Zhang a récemment démontré chez le porc que ce fragment de 23kDa aurait pour origine l'ostéopontine et serait libéré par une hydrolyse endogène semblable à la trypsine [157]. La masse moléculaire du noyau protéique de l'ostéopontine humaine est de 41,5kDa, ce qui représente 301 résidus d'acides aminés. Les résidus majeurs de l'ostéopontine (50%) correspondent aux acides glutamiques et aspartiques, ainsi qu'à la sérine. Dans l'os, l'ostéopontine contient 12 phosphosérines (20% des sérines sont ainsi phosphorylées), une phosphothréonine, 5 ou 6 oligosaccharides O-liés et un oligosaccharide N-lié au noyau protéique. Les résidus d'acide sialique représentent environ 5% de la masse de la protéine. Il apparaît clairement que la phosphorylation de l'ostéopontine par modification post-traductionnelle n'est pas aléatoire, mais correspond à la formation de groupes de 3 ou 4 résidus de phosphate le long de la chaîne polypeptidique (**figure 22**).

Comme la BSP, l'ostéopontine renferme également des résidus de tyrosine sulfatée. Des études menées chez le rat ont décrit plusieurs formes, différant par des modifications



post-traductionnelles (essentiellement de phosphorylation) selon l'origine des tissus et la transformation des cellules [190]. Par exemple, les cellules de rein chez le rat sécrètent deux formes d'ostéopontine dont les propriétés physiologiques diffèrent [191] : la forme phosphorylée (pp69) est non glycosylée, localisée dans la matrice extracellulaire et interagit avec la fibronectine lorsqu'elle est associée à la surface des cellules, alors que la forme non phosphorylée (np69) est N-glycosylée et se complexe uniquement à la fibronectine libre. Dans ces cellules de rein, les ARNm codant pour ces ostéopontines ont des séquences nucléotidiques différentes de celles des ARNm présents dans les cellules ostéoblastiques de rat, ce qui suggère une diversité des ARNm de l'ostéopontine entre tissus. L'ostéopontine, contrairement à la sialoprotéine osseuse, n'est donc pas spécifique de l'os. Chez l'homme, le gène de l'ostéopontine, comme celui de la BSP, est localisé sur le chromosome 4 [192]. Par comparaison des séquences de la protéine entre espèces, on observe 55% d'homologie (excepté pour l'ostéopontine de poulet : 18% d'homologie), et les segments hautement conservés correspondent au site de N-glycosylation, à la séquence poly-Asp (de 6 à 10 résidus d'asparagine), à la séquence GRGDS d'adhésion cellulaire et au site de clivage par la thrombine à proximité de ce motif GRGDS [184, 185]. De plus, on retrouve systématiquement de nombreux résidus phosphorylés, suggérant que certains sites spécifiques puissent être essentiels aux fonctions de la protéine, comme l'interaction avec les ions calcium et l'hydroxyapatite. Enfin, la structure secondaire de l'ostéopontine se composerait de 8 hélices α et de 6 feuillets β [193].

Concernant sa localisation dans l'os, des études immunohistochimiques d'os de rat nouveau-né ont révélé la présence de l'ostéopontine dans la matrice organique extracellulaire, l'ostéoïde, les cellules responsables de la formation osseuse (les pré-ostéoblastes et les ostéoblastes) et dans les ostéocytes [194]. De plus, l'apparition de l'ostéopontine dans les ostéoblastes bien avant la formation de l'ostéoïde, indique une expression précoce de la protéine lors de l'ostéogenèse. Parallèlement, l'ostéopontine est exprimée par les ostéoclastes [195-197] et par divers autres types cellulaires dont les

odontoblastes, les cellules rénales évoquées précédemment, les cellules neuronales, placentaires et les chondrocytes [198]. D'autre part, l'ostéopontine est surexprimée par différentes lignées cellulaires transformées d'origine stromale ou épithéliale [199, 200], suggérant qu'elle interviendrait dans les mécanismes d'adhésion des cellules malignes entre-elles ou avec l'hôte. Enfin, on retrouve l'ostéopontine dans les liquides physiologiques tels que le lait et les urines (uropontine) où elle inhibe la précipitation de l'oxalate de calcium [201]. L'expression et la sécrétion de l'ostéopontine par des cellules modifiées de rat de type ostéoblaste sont stimulées par la 1,25 dihydroxyvitamine D₃, alors que la dexaméthasone diminue le nombre d'ARNm de l'ostéopontine. Ces facteurs hormonaux ont un effet opposé sur la sialoprotéine osseuse. Les TGFβ1 et β2 stimulent la transcription du gène de l'ostéopontine dans ce modèle cellulaire d'ostéoblastes modifiés [202]. L'IL-1 accroît l'expression de l'ostéopontine dans les cultures d'ostéoblastes normaux, alors que la parathormone diminue sa sécrétion [203, 204].

Etant sécrétée à la fois par les ostéoblastes, les ostéocytes et les ostéoclastes, l'ostéopontine est donc susceptible d'être une protéine essentielle aux mécanismes de minéralisation et de résorption de la matrice osseuse. En ce qui concerne la minéralisation de l'ostéoïde, l'ostéopontine présente une forte affinité pour l'hydroxyapatite et se lie aux ions Ca²⁺, ce qui se traduit par une inhibition de la formation et de la croissance du réseau d'hydroxyapatite. Ces propriétés sont attribuées à son contenu important en résidus d'acide aspartique, aux séquences poly-Asp, ainsi qu'à son haut degré de phosphorylation [205, 206]. Des études par immunolocalisation ont décrit une forte concentration de l'ostéopontine au niveau du front de minéralisation d'os néoformés. Il se formerait en fait dans l'os un gradient discontinu de la concentration en ostéopontine, à savoir : 1) une concentration médiane dans l'ostéoïde ; 2) puis maximale au front de minéralisation à proximité de l'ostéoïde ; 3) et enfin une faible concentration dans la zone minéralisée. L'ostéopontine étant un inhibiteur de la formation et de la croissance des cristaux

d'hydroxyapatite *in vitro*, il semblerait en fait que cette protéine influence davantage le taux de minéralisation que l'initiation de la minéralisation [76, 207].

Comme c'est le cas pour la sialoprotéine osseuse, la présence, dans sa séquence protéique, du motif RGD fait de l'ostéopontine une protéine d'adhésion cellulaire, et, plus précisément, elle contribue dans l'os à l'adhésion des ostéoclastes sur la matrice par son interaction avec le récepteur de la vitronectine ($\alpha_v\beta_3$). La forte densité de charges négatives à proximité de la séquence RGD et sa capacité à lier les ions calcium suggèrent que la concentration en calcium libre puisse affecter l'interaction de l'ostéopontine avec le récepteur $\alpha_v\beta_3$. La liaison de l'ostéopontine sur ce récepteur membranaire se traduit donc par une diminution de la concentration intracellulaire en calcium, entraînant la formation de podosomes, donc l'activation des ostéoclastes [208]. En outre, l'ostéopontine est sensible au clivage par la thrombine et le site de clivage est localisé à six résidus de l'extrémité carboxylique du segment RGD. Cette réaction d'importance physiologique inexplicée pourrait alors altérer la fonction d'adhésion cellulaire attribuée à l'ostéopontine. De plus, l'extrémité N-terminale du peptide libéré par la thrombine interagit avec un second récepteur de type intégrine ($\alpha_9\beta_1$) qui reconnaît également la tenascine [209]. Contrairement à la BSP qui est localisée à l'interface du cartilage et de l'os, l'ostéopontine est principalement retrouvée à proximité des cellules où la résorption osseuse est particulièrement active [210]. L'ostéopontine pourrait donc participer à la régulation de la résorption osseuse [13, 20, 178], en favorisant l'ancrage des ostéoclastes à la surface de la matrice minérale (formation d'un « pont osseux »). Des études récentes ont également décrit la formation d'un complexe spécifique entre l'ostéopontine et l'ostéocalcine qui pourrait, en se basant sur les fonctions probables de ces deux protéines, favoriser le recrutement des précurseurs ostéocalstiques à la surface de la matrice osseuse [211].

Enfin, en marge du tissu osseux, l'ostéopontine est présente en abondance dans les

		Ostéopontine	BSP
plaques d'athérome où elle			
serait impliquée dans les	Masse moléculaire globale en	63,000	78,000
mécanismes de calcification	kDa (SDS-PAGE)		
de ces lésions artérielles	Masse moléculaire du noyau	32,627	33,600
[112]. De même, elle semble	protéique en kDa		
intervenir dans le	% Acide sialique (poids sec)	4,4	4,7
développement des foyers	Nombre d'acides aminés	317	303
de calcification observés	Longueur de l'ARNm	1,4	2,0
dans les tumeurs du sein	Acides aminés majeurs/1000		
[113, 114], comme c'est	Asp	142	53
d'ailleurs le cas pour la	Asn	24	66
	Glu	112	205
	Gln	51	30
	Ser (Ser-P)	153 (24)	66 (31)
	Thr (Thr-P)	41 (1)	24 (3)
	Gly	20	109
	Séquence RGD	+	+

Tableau 6 : Comparaison structurale de l'ostéopontine et de la sialoprotéine osseuse

sialoprotéine osseuse [115], où on la retrouve à des concentrations dix fois plus élevées. Enfin, des études récentes [116] ont montré une corrélation de l'expression de l'ostéopontine avec le potentiel métastatique de certaines lignées cellulaires (fibroblastes transformés). Ainsi, elle pourrait jouer un rôle dans la migration et l'adhérence des cellules tumorales à la matrice osseuse [118].

C.IV.3. La Bone Acidic Glycoprotein 75kDa (BAG-75)

Cette glycoprotéine est une sialoprotéine qui a récemment été identifiée à partir d'os de rat [112]. C'est une glycoprotéine acide, riche en acides aminés acides (29%), en phosphate (7,9%) et elle contient de l'acide N-acétyl neuraminique (acide sialique, 7%). Elle serait spécifique de l'os et produite par les ostéoblastes [117]. La BAG-75 est apparentée aux précédentes glycoprotéines acides de l'os (BSP et ostéopontine), mais elle est issue d'un gène distinct. La séquence amino-terminale de la protéine est différente de celles de la BSP et de l'ostéopontine, et l'utilisation d'un anticorps spécifique de la BAG-75 ne révèle ni la BSP, ni l'ostéopontine, ni même les protéoglycannes de l'os (biglycan et décorine). Toutefois, ce même anticorps révèle un fragment de 50kDa libéré vraisemblablement par une protéase endogène à partir de la protéine de 75kDa. Ce

fragment de 50kDa est présent à la fois dans les tissus calcifiés et dans le sérum. Par comparaison avec la BSP et l'ostéopontine, la BAG-75 présente la capacité de liaison au calcium la plus forte [218]. Ainsi, comme les précédentes sialoprotéines, cette glycoprotéine acide pourrait intervenir lors de la minéralisation de la matrice organique de l'os.

Le rôle de la BAG-75 n'est pas clairement établi, mais Sato [219] a démontré qu'elle était, *in vitro*, un inhibiteur de la résorption osseuse. Elle se lie en fait à la surface du minéral et le complexe formé inhibe la résorption par un mécanisme indépendant du récepteur de la vitronectine.

C.IV.4. La sialoprotéine 59 et/ou 64kDa (BSP-59/64) de rat

Comme les précédentes, cette glycoprotéine est une sialoprotéine (1,4% d'acide sialique) mais elle ne contient pas de phosphore. On la retrouve spécifiquement dans des tissus calcifiés (dents et os) et plus précisément dans les ostéoblastes, les ostéocytes et la matrice extracellulaire osseuse

de rat [220]. L'analyse de la

séquence en acides aminés a

révélé de fortes homologues avec

une glycoprotéine plasmatique

humaine : l' α_2 HS glycoprotéine

(tableau 7). L' α_2 HS glycoprotéine

est connue pour être synthétisée

par les hépatocytes, transportée

dans la circulation sanguine et

incorporée dans les tissus

calcifiés. Il s'avère en fait que la

BSP-59 est synthétisée sous une

	BSP-59 de rat	BSP-64 de rat	α_2 HS gp humaine
<i>Acides aminés /1000</i>			
Asp/Asn	89	97	86
Thr	56	57	57
Ser	38	45	57
Glu/Gln	117	121	115
Pro	93	98	112
Gly	86	79	63
Ala	106	120	103
Cys	6	ND	35
Val	107	86	98
Met	ND	ND	3
Ile	29	32	23
Leu	82	86	83
Tyr	14	16	20
Phe	49	46	29
Lys	42	41	46
His	46	28	35
Arg	40	48	35
<i>% poids sec</i>			
Phosphate	ND	0,05	0,00
Acide sialique	1,4	1,4	5,2

Tableau 7 : Comparaison des sialoprotéines 59 et 64kDa de rat avec l' α_2 HS glycoprotéine humaine

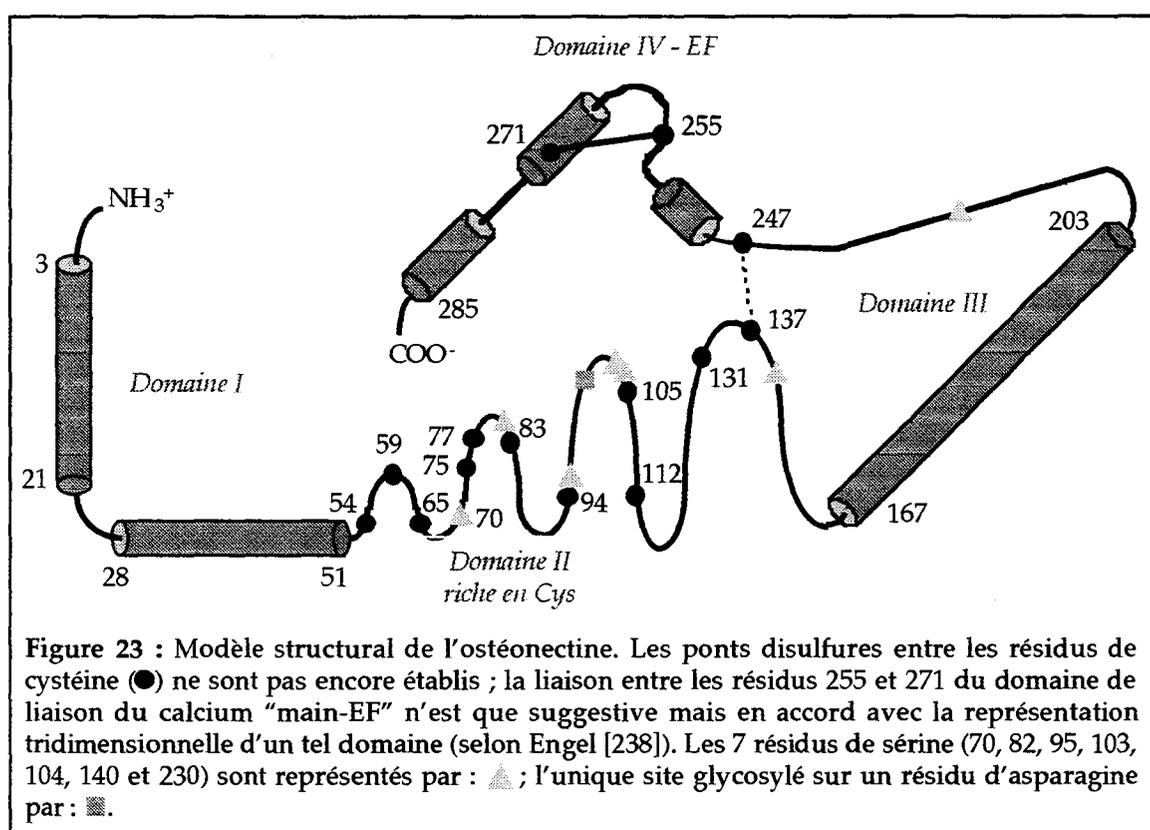
forme polypeptidique simple à la fois par les ostéoblastes et les hépatocytes. En cela, elle diffère de l'hétérodimère α_2 HS glycoprotéine, mais la BSP-59 pourrait être l'homologue chez le rat de l' α_2 HS glycoprotéine humaine.

Une seconde BSP de rat, la BSP 64kDa (ou 62kDa selon Wendel [221]), avait auparavant été mise en évidence chez le rat par Franzen et Heinegard [222], mais d'après la détermination de la composition en acides aminés, il est très probable que ces deux protéines soient identiques. Les différences observées correspondraient aux variations d'extraction des deux protéines, la BSP-59 étant isolée de la mâchoire inférieure de rat, alors que la BSP-64 l'était d'un fémur de rat. En outre, cette sialoprotéine osseuse de 62-64kDa aurait pour origine le foie mais s'accumule abondamment dans le tissu osseux.

C.IV.5. L'ostéonectine (SPARC)

L'ostéonectine est une glycoprotéine acide (pI ostéonectine bovine : 5.5) de 29kDa, 287 résidus d'acides aminés, purifiée et décrite originellement à partir d'os foetal bovin où elle constitue près de 20% des protéines non collagéniques [223, 224]. Ultérieurement, la localisation et la synthèse de cette glycoprotéine ont été décrites dans de nombreux tissus non minéralisés : elle est synthétisée par les cellules endothéliales et les mégacaryocytes [225] puis s'accumule dans les plaquettes [226, 227]. Par ailleurs, l'ostéonectine est similaire à une protéine murine sécrétée par l'endoderme pariétal : la SPARC (*acidic protein secreted and rich cysteine*) [228]. L'ostéonectine est donc présente et exprimée dans des tissus minéralisés et non minéralisés. Dans le fœtus bovin, sa concentration est environ 1000 fois plus élevée que dans les tissus non minéralisés, soit approximativement 150 μ g/mg de protéines [229]. Cependant, l'os de rat contient des quantités bien plus faibles, résultant vraisemblablement de différences structurales du domaine N-terminal, ce qui diminue l'affinité de l'ostéonectine de rat pour l'hydroxyapatite [230]. Elle est synthétisée sous la forme d'une simple chaîne polypeptidique de type pré-ostéonectine de masse moléculaire apparente de 45kDa [231].

L'ostéonectine est une protéine très conservée puisque la séquence des exons présente plus de 90% d'identité entre toutes les espèces étudiées à ce jour [232]. Elle est le produit d'un gène unique, mais il semble exister des variantes, comme pour l'ostéonectine plaquettaire qui présente une masse moléculaire en gels SDS plus élevé que l'ostéonectine osseuse [233], en raison d'un type différent de glycosylation [234]. D'autre part, l'utilisation d'un anticorps dirigé contre l'ostéonectine osseuse présente une affinité cent fois plus faible pour l'ostéonectine plaquettaire [235] et l'épitope impliqué ne semble pas dépendant de la glycosylation de la protéine [236]. Cette glycoprotéine renferme 3% d'acide sialique, 1,6% d'hexosamine et 0,5% de phosphore [237].



L'ostéonectine présente différents domaines structuraux dont un domaine amino-terminal de 50 acides aminés riche en résidus d'acide glutamique (figure 23). Ce segment lie les ions calcium (de 5 à 8 Ca^{2+}), ce qui entraîne une transition conformationnelle avec renforcement de la structure en hélice α . L'ostéonectine isolée de l'os se lie effectivement à l'hydroxyapatite avec une haute affinité ($K_d = 8 \cdot 10^{-8} \text{M}$) [238] et le site de liaison serait constitué par ce domaine très acide de la protéine. Un autre domaine de 100 acides aminés

contient 11 résidus de cystéine, soit un nombre élevé probable de ponts disulfures. Ce deuxième segment renferme de plus un site de N-glycosylation (en position 98) susceptible de moduler l'interaction de l'ostéonectine avec le collagène de type V [239]. Le troisième domaine renferme également 100 résidus d'acides aminés et le quatrième (de 50 résidus) contient un site de liaison du calcium de type « main-E-F » à haute affinité, comme l'ont montré les études physico-chimiques ($K_d = 3 \cdot 10^{-7}$ M) et les différentes études de liaison directe du ^{45}Ca sur des fragments d'ostéonectine transférés sur membrane [230, 240]. En dehors de sa liaison au calcium et à l'hydroxyapatite, les premières descriptions de l'ostéonectine évoquaient également une liaison à la gélatine [223] et plus récemment à du collagène purifié [241] ; toutefois, ces observations n'ont pu être confirmées sur du matériel isolé à partir d'os de porc, et restent donc controversées. Parallèlement, le clivage de l'ostéonectine par une métalloprotéase spécifique augmente la liaison au collagène de type I, et l'ostéonectine produite par les cellules endothéliales se lie, *in vitro* et en présence de calcium, aux collagènes de types III, V, II et I par ordre décroissant d'affinité [240], ainsi qu'à l'albumine [242]. Enfin, les ostéonectines d'os bovin et de plaquettes humaines se lient uniformément à la thrombospondine [339]. Ces deux formes protéiques diffèrent par leur glycosylation, à savoir une N-glycosylation de type oligomannosidique pour l'ostéonectine osseuse et de type complexe pour l'ostéonectine plaquettaire [243]. Il semble donc que les variations structurales associées aux modifications post-traductionnelles gouvernent les spécificités tissulaires de l'ostéonectine.

Cette glycoprotéine est hautement exprimée dans les ostéoblastes (dans le réticulum endoplasmique, l'appareil de Golgi et les vésicules de sécrétions post-Golgi), les précurseurs cellulaires des ostéoblastes et les ostéocytes jeunes [244]. Dans la matrice osseuse, on la retrouve essentiellement au front de minéralisation de l'ostéoïde. Les récentes études par immuno-marquage en microscopie électronique [245] suggèrent en fait que l'ostéonectine serait piégée par la phase minérale osseuse, plutôt que par la phase

organique. Parallèlement, l'ostéonectine présente un renouvellement rapide dans les tissus minéralisés et son expression dans l'os serait alors à mettre en relation avec le processus de remodelage. De plus, sa synthèse, *in vitro*, par les ostéoblastes serait inhibée à la fois par le TGF β [246] et par la 1,25 dihydroxyvitamine D₃ [247].

En dépit de ces observations et de son abondance dans la matrice osseuse, les effets biologiques de l'ostéonectine n'ont pu être obtenus que dans des systèmes non minéralisants. Ainsi, les données reçues sur les cellules en culture et les plaquettes suggèrent que l'ostéonectine est impliquée dans les interactions cellule-substrat et cellule-cellule, peut-être en collaboration avec d'autres molécules. Pour exemples, l'ostéonectine pourrait se lier aux cellules endothéliales [248], faciliterait la différenciation ou la migration cellulaire en bloquant le passage de la phase G1 à la phase S du cycle cellulaire [249], inhiberait la liaison du PDGF-B ou AB sur son récepteur en interagissant avec ce récepteur [250], participerait à l'agrégation plaquettaire et se lierait à la thrombospondine [226]. L'ostéonectine pourrait donc jouer de tels rôles dans l'os, où précisément les mouvements cellulaires sont essentiels au couplage entre formation et résorption osseuses. *In vitro*, l'ostéonectine bovine stimule également la précipitation du calcium et du phosphate en présence de collagène et interagirait à la fois avec les collagènes de types III, V, II et I [238]. Elle pourrait ainsi initier la cristallisation du réseau d'hydroxyapatite en augmentant la concentration locale du calcium et en permettant les liaisons entre les phases minérale et organique du tissu osseux. Mais ces résultats sont en contradiction avec ceux obtenus récemment où l'ostéonectine ne présente pas d'affinité avec le collagène de type I [181]. Enfin, l'expression de l'ostéonectine est augmentée dans des cellules mammaires cancéreuses et, avec l'ostéopontine et la sialoprotéine osseuse, elle pourrait participer au phénomène de microcalcification communément associé au cancer du sein [214].

C.V. LES AUTRES PROTEINES A SEQUENCE RGD (ARG-GLY-ASP)

En plus des sialoprotéines osseuses et du collagène [251], on retrouve dans l'os des protéines portant le motif d'adhésion et de reconnaissance cellulaire RGD. Ces nouvelles protéines sont cependant non spécifiques de l'os et sont généralement localisées dans de nombreuses matrices extracellulaires et parfois dans le plasma.

C.V.1. La thrombospondine

C'est une glycoprotéine adhésive de 450kDa libérée abondamment par les plaquettes sanguines, après stimulation par la thrombine. Elle est également un produit de biosynthèse de différents tissus conjonctifs et un composant de nombreuses matrices extracellulaires. Dans l'os, elle est synthétisée par les ostéoblastes [252]. On la retrouve dans l'ostéoïde et la matrice minérale [44].

On dénombre cinq formes de thrombospondine codées par des gènes différents, ainsi que plusieurs isoformes résultant d'épissages variables de l'ARNm. Les thrombospondines sont des protéines multimériques de trois chaînes de 150 à 180kDa. On distingue un domaine globulaire amino-terminal de 30kDa, une partie linéaire de 85kDa et un second domaine globulaire carboxy-terminal de 70kDa. La synthèse de la thrombospondine est stimulée par le TGF β . Elle chélate les ions calcium par l'intermédiaire d'un site de type « main E-F » et possède une séquence RGD. Elle se lie aux collagènes (type I à IV uniformément, type V avec plus d'affinité), à la fibronectine, au fibrinogène, au plasminogène et à la laminine. Dans l'os, les thrombospondines 1 et 2 sont exprimées et pourraient moduler l'adhésion et la prolifération cellulaire [253]. Enfin, elle se lie à l'ostéonectine et la co-distribution de ces deux protéines, ainsi que leur intervention dans l'adhésion cellulaire et l'agrégation plaquettaire, suggèrent un rôle coopératif [254].

C.V.2. La fibronectine

La fibronectine est une protéine de masse moléculaire proche de 500kDa, présente dans de nombreuses matrices extracellulaires [255]. C'est une protéine multimérique

constituée de deux types de chaînes non identiques de 250kDa chacune. Elle présente des propriétés de liaisons multiples (comme celle de se lier au collagène de type I), possède une séquence RGD, et se comporte ainsi comme un pont entre la surface des cellules et la matrice extracellulaire. On distingue plusieurs types de fibronectine qui diffèrent par leur séquence, leurs propriétés et leur distribution. Dans l'os, la synthèse de la fibronectine dans les ostéoblastes est stimulée par le TGF β [246], et diminuée par les glucocorticoides [256]. Elle serait localisée dans le périoste et au contact des ostéocytes, mais les études divergent quant à sa présence dans la matrice minéralisée [62].

C.V.3. La ténascine C

La ténascine C est une glycoprotéine d'environ 200kDa qui a récemment été mise en évidence dans les cellules pré-ostéoblastiques et les ostéoblastes [257]. Cette glycoprotéine est connue sous plusieurs formes résultant d'un épissage alternatif [258], mais seule celle de plus haut poids moléculaire serait exprimée par les ostéoblastes. Au cours du développement embryonnaire, la ténascine est concentrée à l'interface entre les ébauches cartilagineuses primaires des os longs et le périchondre. La nature exacte des stades de différenciation ostéoblastique qui expriment la ténascine lors de l'ossification reste à établir. De plus, le rôle biologique de cette glycoprotéine dans le tissu osseux est à préciser, de même qu'il semble que la ténascine ne soit pas intégrée à la matrice minéralisée. Globalement, elle présente des propriétés antiadhésives similaires à celles décrites pour l'ostéonectine.

C.VI. LES PROTEINES D'ORIGINE PLASMATIQUE

En raison de l'importante surface d'interaction des cristaux d'hydroxyapatite, l'os est capable de fixer un grand nombre de molécules circulantes. De plus, l'os est un tissu vascularisé et il n'est pas surprenant d'y retrouver ces protéines plasmatiques. Une étude en électrophorèse bidimensionnelle sur un extrait d'os cortical bovin a d'ailleurs permis d'identifier une quarantaine de protéines, dont quatorze seulement sont absentes du sérum et sont donc spécifiquement produites dans l'os [259]. Parmi les protéines adsorbées

d'origine sérique, on retrouve l'albumine et la fétuine ou l' α_2 HS-glycoprotéine, de loin les plus abondantes, puis, à un degré moindre, des immunoglobulines, la transferrine, l' α_1 -glycoprotéine, l' α_1 -antitrypsine, l'hémoglobine et l'apoA1-lipoprotéine. Parmi les protéines plasmatiques, seule l' α_2 HS-glycoprotéine est supposée intervenir dans le métabolisme osseux chez l'homme. De plus, la fétuine bovine apparaît être l'homologue de l' α_2 HS-glycoprotéine humaine, aussi ne seront décrites que ces deux protéines plasmatiques dont les quantités dans l'os font d'elles des protéines majeures de ce tissu.

C.VI.1. L' α_2 HS-glycoprotéine humaine

L' α_2 HS-glycoprotéine a originellement été découverte et fractionnée dans le sérum humain par Heremans en 1960, par utilisation d'une solution contenant les ions Zn^{2+} [260], d'où son nom initial d' α_2 -Z-globuline. Indépendamment Schmid et Bürgi en 1961 ont décrit une protéine plasmatique précipitant aisément en présence d'ions Ba^{2+} qu'ils nommèrent Ba- α_2 -glycoprotéine [261]. Enfin, Schultze, en 1962 attribua la même identité à ces deux glycoprotéines et les rebaptisa sous le nom d' α_2 HS-glycoprotéine en hommage à ses découvreurs Heremans et Schmid.

L' α_2 HS-glycoprotéine est une protéine bicaténaire de 49kDa, codée par un seul gène porté chez l'homme par le chromosome 3. Cette glycoprotéine est synthétisée à partir d'un simple brin d'ARNm, transcrit en une pré-protéine de 367 résidus d'acides aminés. La pré-protéine comprend une séquence de 18 résidus d'acides aminés suivie d'une chaîne lourde A, d'une région interchaîne (ou « connecting peptide ») de 40 résidus, puis d'une chaîne légère B [262]. Il semble que la région interchaîne soit libérée de la forme native par protéolyse mais ce peptide n'a encore jamais été isolé. La fonction de ce peptide, de même que la nature des enzymes de coupure demeurent inconnues.

Dans la protéine mature, on distingue donc une chaîne lourde A [263] et une chaîne

légère B. La chaîne lourde A est constituée de 282 résidus d'acides aminés (30,169kDa) dont 24 doublets (les plus fréquents étant Pro-Pro et Ala-Ala : 5 doublets ; Leu-Leu et Val-Val : 3 doublets ; Glu-Glu : 2 doublets), 3 séquences Gly-X-Pro et 1 séquence Gly-Pro-X caractéristiques des séquences répétitives des collagènes. 25% des acides aminés de la chaîne lourde sont acides (acides aspartique et glutamique) et on retrouve également 11 résidus de cystéine formant 5 ponts disulfure. Le onzième résidu forme un sixième pont avec la chaîne B de l' α_2 HS-glycoprotéine. Parallèlement, la chaîne A s'organise en hélice α (29%), en feuillet β (24%) et en coude β (26%). On y dénombre 4 sites de glycosylation, soit 2 de type N sur les résidus d'asparagine en positions 138 et 158 dans le coude β , et 2 de type O sur les résidus de thréonine en positions 238 et 252 dans les segments random coil. Enfin, cette chaîne A de l' α_2 HS-glycoprotéine contient deux domaines de type cystatine présentant de fortes homologues de séquence avec le kininogène. Ainsi, l' α_2 HS-glycoprotéine pourrait agir comme inhibiteur des protéases à cystéine au cours du processus de résorption osseuse [264].

La chaîne légère B [265], constituée de 27 résidus d'acides aminés (3,386kDa), forme un pont disulfure avec la chaîne A. L'extrémité amino-terminale de la chaîne B est hydrophobe (résidus de 1 à 20) et les résidus de proline et de valine représentent à eux seuls 40% des acides aminés. On note 2 séquences Val-Val et 1 séquence Ala-Ala-Ala. Cette chaîne légère s'organise en une petite hélice α et en 2 coudes β . Un site unique de O-glycosylation a été décrit dans le premier coude β (sérine en 6), rendant cette région légèrement hydrophile.

Globalement l' α_2 HS-glycoprotéine est une protéine acide (pI = 4.2). Elle est synthétisée par les hépatocytes et s'accumule fortement, mais variablement, dans le tissu osseux (elle y est 300 fois plus concentrée que tout autre protéine plasmatique) : l'os foetal renferme 10 fois plus d' α_2 HS-glycoprotéine que l'os adulte (concentration supérieure à celle du plasma), et

l'os néonatal 7 fois plus [266, 267]. La concentration plasmatique de l' α_2 HS-glycoprotéine de l'homme adulte est comprise entre 400 et 800 μ g/mL.

La fonction biologique de l' α_2 HS-glycoprotéine reste obscure. Toutefois, elle présente une affinité élevée pour l'hydroxyapatite, et elle est chimio-attractive pour les monocytes [268]. De plus, *in vitro*, elle mobilise les ions calcium et modulerait ainsi la résorption osseuse en influençant la phase minérale de l'os [269]. Par ailleurs, la concentration plasmatique de l' α_2 HS-glycoprotéine est caractéristique de certaines pathologies ou de certaines conditions physiologiques. Ainsi, en cas de malnutrition ou d'atteinte de la maladie de Paget, et sous certaines conditions inflammatoires [270], la concentration plasmatique de l' α_2 HS-glycoprotéine décroît fortement. De plus, dans certains cancers, le taux sérique de cette glycoprotéine est en relation avec la diminution de l'activité lymphocytaire, suggérant ainsi une relation entre l' α_2 HS-glycoprotéine et la dépression immunitaire. Son taux osseux est, inversement, très supérieur à la normale dans le cas d'ostéogénèse imparfaite, si bien que, si cette glycoprotéine avait un lien avec le métabolisme osseux, on devrait le lui accorder dans les processus formation ou de résorption.

Par comparaison des séquences entre l' α_2 HS-glycoprotéine et les protéines plasmatiques ayant pour origine d'autres mammifères, il apparaît que l' α_2 HS-glycoprotéine humaine présente de nombreuses homologies avec la fétuine bovine [271], et la sialoprotéine de 59kDa de rat décrite précédemment [220]. Ces protéines pourraient donc correspondre aux homologues de l' α_2 HS-glycoprotéine chez le boeuf et le rat.

C.VI.2. La fétuine bovine

La fétuine bovine, initialement isolée et caractérisée par Pedersen en 1944 [272], est une glycoprotéine majeure du sérum de veau, membre de la famille des α globulines. Elle représente en effet jusqu'à 50% des protéines plasmatiques fœtales [273]. Depuis, des protéines apparentées à la fétuine bovine ont été identifiées chez un nombre varié de

mammifères dont le mouton, le rat, la souris, la chèvre, le cheval, le chat et le kangourou. On admet depuis peu que l' α_2 HS-glycoprotéine humaine et la fétuine bovine sont deux protéines spécifiques d'espèce [274, 275] et sont des membres de la superfamille des cystatines [264]. Les séquences en acides aminés ont révélé 68% d'homologie entre l' α_2 HS-glycoprotéine et la fétuine bovine, tandis que les fétuines bovine et ovine présentent 94% d'homologie [271].

Au contraire de l' α_2 HS-glycoprotéine, la fétuine bovine est constituée par une simple chaîne d'acides aminés [275], mais les résidus de cystéine semblent conservés entre ces deux glycoprotéines (12 résidus en positions identiques). Néanmoins, seule une séquence de type collagène est retrouvée dans la séquence primaire de la fétuine, contre 3 dans l' α_2 HS-glycoprotéine. La fétuine porte 3 O-glycannes de type mucine [276] et 3 N-glycannes [277] dont les positions 138 et 158 sont conservées avec celles de l' α_2 HS-glycoprotéine.

Les variations majeures entre la fétuine et l' α_2 HS-glycoprotéine sont localisées à l'extrémité carboxy-terminale et il est probable que ces régions soient impliquées dans les fonctions biologiques (évidemment différentes) de ces protéines. En effet, aucune fonction commune n'a pu être attribuée à ces protéines. Il semble que la fétuine bovine ait des propriétés stimulatrices des lymphocytes, en plus de la capacité de se lier aux lipides et de stimuler la lipogénèse. Le site de biosynthèse de la fétuine est le foie où elle est synthétisée sous forme d'une pré-protéine. Sécrétée dans le plasma, elle y circule sous la forme d'une chaîne unique qui, au contraire de l' α_2 HS-glycoprotéine, ne subit pas de modification protéolytique post-traductionnelle.

En conclusion, le haut degré d'homologie entre la fétuine et l' α_2 HS-glycoprotéine intrigue d'autant plus qu'aucune fonction biologique commune n'a pu à ce jour être attribuée à ces deux protéines. Toutefois, il semble que la fétuine bovine soit l'homologue de l' α_2 HS-glycoprotéine humaine. A la fétuine bovine s'ajoute enfin la sialoprotéine de

59kDa isolée du rat dont l'identité structurale se rapproche indéniablement de l' α_2 HS-glycoprotéine.

C.VII. CONCLUSION

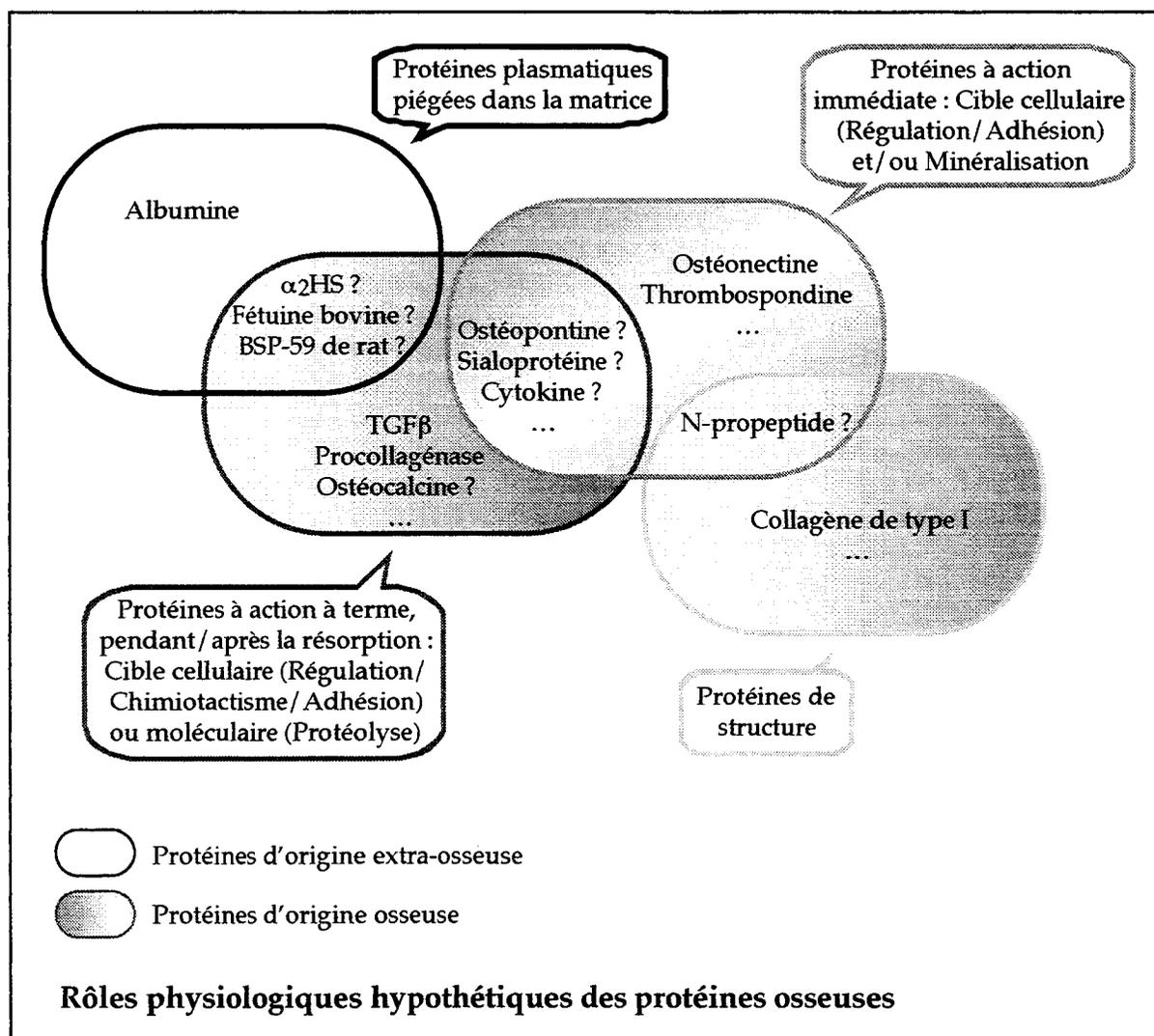
Les constituants majeurs de la matrice osseuse sont à ce jour identifiés, clonés et séquencés. La matrice organique d'un fémur de bovin représente approximativement 24% de la masse osseuse où le collagène de type I constitue 90% des protéines de la matrice. Globalement on dénombre 4 grandes familles de protéines dans l'os, à savoir les protéines de structure (collagènes et protéoglycannes), les phospho/sialoprotéines (sialoprotéine osseuse (BSP), ostéopontine, BAG-75, BSP-59/-64 et ostéonectine), les Gla protéines (ostéocalcine et Gla protéine matricielle) et les protéines plasmatiques (albumine, α_2 HS-glycoprotéine humaine et/ou fétuine bovine). En marge de ces familles, on retrouve la thrombospondine et la ténascine qui possèdent la séquence tripeptidique RGD d'adhésion cellulaire commune à la BSP, l'ostéopontine et la BAG-75. De plus de nombreux facteurs de croissance et protéases sont présents dans l'os et contribuent au métabolisme de ce tissu.

A l'exception de l'ostéocalcine et de la sialoprotéine osseuse, aucune des protéines non collagénique n'est spécifique de l'os. Toutefois, ces protéines sont capables d'interagir les unes avec les autres et avec le collagène de type I, pour établir l'architecture de la matrice organique osseuse et permettre ensuite la minéralisation.

Même si certaines interactions spécifiques sont bien établies, les détails de l'organisation de la matrice restent inconnus. De nombreux résultats expérimentaux ont permis d'élaborer des hypothèses sur le rôle de ces protéines dans la physiologie du tissu osseux, sans permettre encore d'élaborer un schéma d'ensemble cohérent. Les protéines osseuses sont exprimées à différents stades du processus de maturation, c'est à dire du précurseur jusqu'à l'ostéoblaste différencié ou même l'ostéocyte. Cette expression séquentielle est, en outre, l'objet d'une régulation hormonale. L'étude de modèles *in vitro* de l'ostéogenèse

suggère une production initiale du collagène de type I suivie, au cours de la maturation de la matrice, de la production de la phosphatase alcaline et de la Gla protéine matricielle, l'expression de l'ostéopontine et de l'ostéocalcine étant simultanée au stade de minéralisation de la matrice [61]. Parallèlement, des études récentes suggèrent des différences notables quant à la production de protéines osseuses spécifiques (ostéocalcine et collagène de type I) entre os cortical et os trabéculaire [278] dont la structure et le processus de remodelage varient.

L'étude de ces variations et l'influence des protéines de l'os sur les interactions cellule-cellule et cellule-matrice fourniront bientôt des informations essentielles afin de mieux comprendre l'étendue du rôle que jouent ces protéines dans la croissance et le remodelage osseux.



D. LA GLYCOSYLATION DES PROTEINES

D.I. INTRODUCTION

Un grand nombre de protéines présentes dans l'organisme, y compris dans l'os, contiennent des chaînes glycaniques et correspondent donc à des glycoprotéines. En raison de la difficulté d'étude de la structure des chaînes glycaniques, leur aspect fonctionnel a longtemps été ignoré. Depuis ces 15 dernières années, les connaissances sur la glycosylation et les rôles biologiques attribués à ces structures ont considérablement évolué [279, 280]. Au contraire des protéines et des acides nucléiques, les variations structurales des chaînes glucidiques susceptibles d'exister à partir d'un petit nombre d'unités monosaccharidiques sont très grandes : à partir de deux acides aminés on ne peut obtenir qu'une seule structure après liaison de l'un avec l'autre, alors que, par exemple, un résidu de N-acétylglucosamine peut former un disaccharide avec les 4 groupes hydroxyles des carbones 2, 3, 4 ou 6 d'un résidu de mannose ; les possibilités d'anoméries α ou β de la liaison s'additionnent et le résidu de N-acétylglucosamine, dans cet exemple, peut s'arranger sous les formes furaniques ou pyraniques, si bien que 16 isomères de structure doivent être considérés pour la liaison de ces deux monosaccharides.

Parallèlement, des groupements phosphate, sulfate, acétyle ou méthyle peuvent se lier de façon covalente sur les monosaccharides, si bien qu'en théorie il existe une énorme diversité de glycannes.

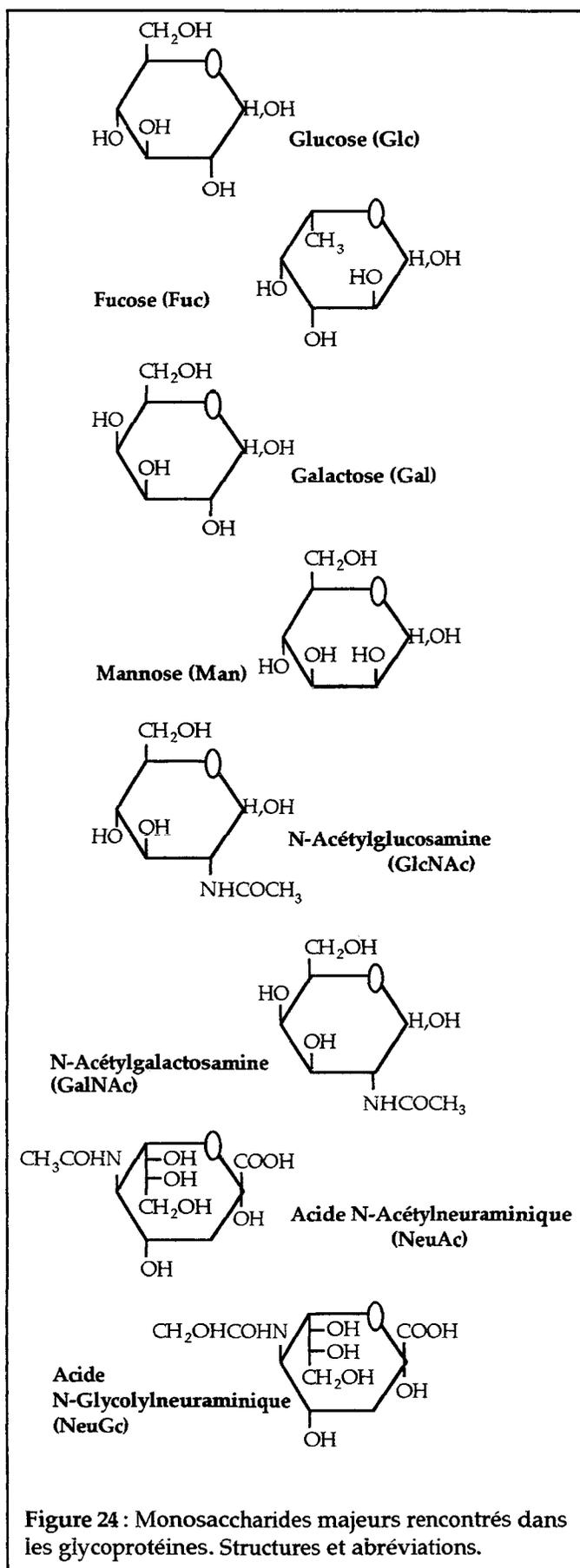
En marge de cette multiplicité structurale, la plupart des glycoprotéines portent plus d'une chaîne glycanique liées de façon covalente en différentes positions du polypeptide, communément sur des résidus d'asparagine dans le cas d'une N-glycosylation, ou/et sur des résidus de sérine ou de thréonine dans le cas d'une O-glycosylation. Les structures majeures des monosaccharides rencontrés dans les glycoprotéines sont décrites **figure 24** (p.81). Une grande diversité biologique dérive du fait que la glycosylation correspond à des modifications post-traductionnelles dépendantes de l'espèce, du type cellulaire, de

l'arrangement squelettique de la protéine et des sites de liaison des monosaccharides.

D.II. LIAISONS DES CARBOHYDRATES AUX PEPTIDES

La liaison covalente des N-glycannes sur le noyau peptidique correspond classiquement à la liaison d'un résidu de N-acétylglucosamine sur une asparagine généralement incluse dans une séquence consensus Asn-X-Ser/Thr (où X ne peut être la proline). Cette séquence n'est toutefois pas suffisante pour qu'il y ait N-glycosylation. Récemment, d'autres monosaccharides se liant à l'asparagine ont été décrits et correspondent à l' α -glucose, le β -glucose, le L-rhamnose et la β -N-acétylgalactosamine.

Concernant les O-glycannes, la liaison la plus courante est celle rencontrée dans les mucines où la N-acétylgalactosamine est liée de façon covalente sur des résidus de sérine ou de thréonine. La N-acétylglucosamine, l' α -galactose, le β -



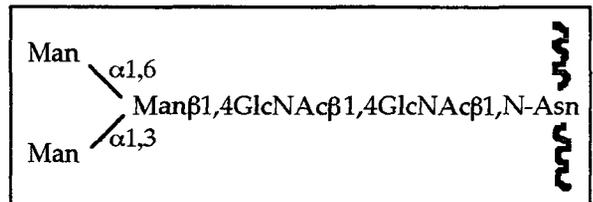
glucose, l' α -mannose et le xylose ont également été décrits dans ce type de liaison O-

glycosidique. Enfin la tyrosine (Glc α -Tyr ou Glc β -Tyr), l'hydroxylysine (Gal-Hyl) et l'hydroxyproline (L-Ara-Hyp ou Gal-Hyp) s'ajoutent aux résidus de sérine ou de thréonine parmi les acides aminés O-liés.

D.III. LES N-GLYCANNES

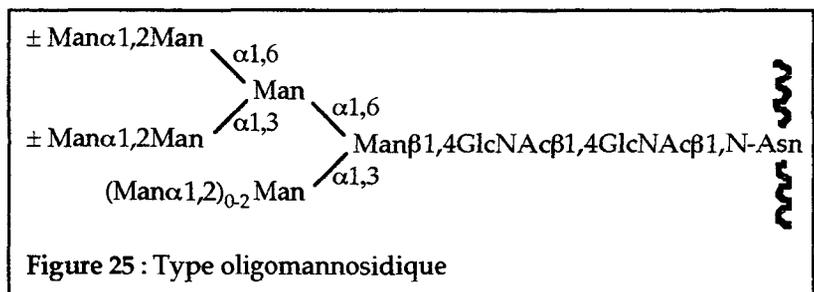
Globalement tous les N-glycannes [281] possèdent un noyau commun, le trimannosyl-di-Nacétylchitobiose lié à un résidu asparaginyll représenté ci-dessous.

La nature des monosaccharides substituant ce noyau pentasaccharidique détermine les différentes classes de N-glycannes [282].



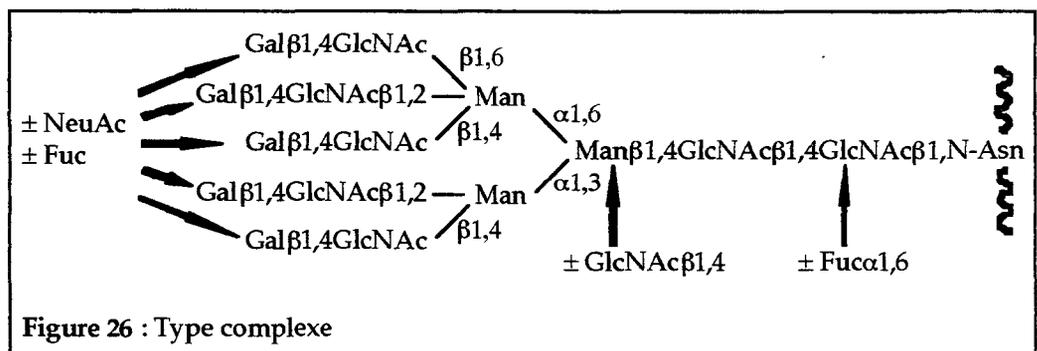
Le type oligomannosidique (figure 25) correspond à une substitution par des résidus de mannose variant dans leur position et leur nombre : la structure minimale dite « Man5 » conduit à la structure limite « Man9 » par une nouvelle substitution de 1 à 4 résidus de mannose liés en α 1,2.

Les glycannes de type complexe (figure 26) ou encore N-acétyllactosaminiques dérivent de la



substitution des résidus α -mannosyl du noyau commun par 1 à 6 unités N-acétyllactosaminique Gal- β 1,4-GlcNAc ; cet arrangement pouvant générer des structures mono-jusqu'à hexa-antennées. Une N-acétyllglucosamine dite intercalaire et du fucose peuvent également se lier respectivement aux résidus β -mannosyl et N-acétyllglucosamine. Enfin,

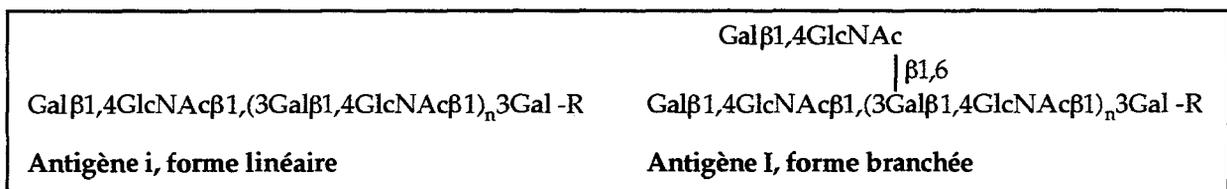
les antennes sont également susceptibles d'être substituées,



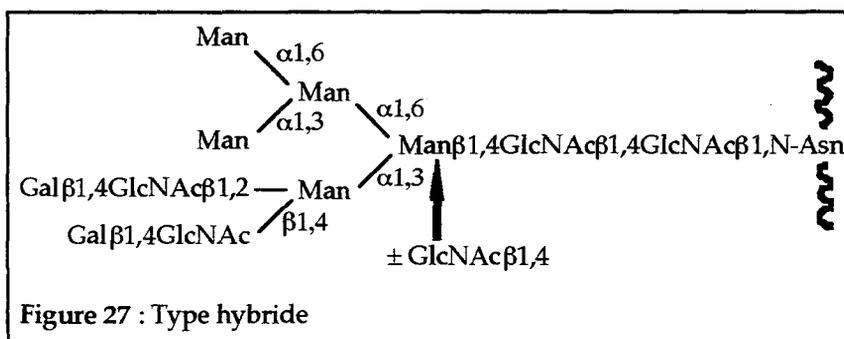
contribuant ainsi à une grande hétérogénéité structurale : ces antennes se retrouvent

fréquemment sialylées par de l'acide N-acétyl-neuraminique lié en $\alpha 2,3$ ou en $\alpha 2,6$ sur les galactoses terminaux, parfois polysialylées comme c'est le cas pour les molécules d'adhésion aux cellules nerveuses (N-CAM) [283]. Parallèlement la fucosylation des monosaccharides du motif N-acétyllactosaminique conduit à la formation de déterminants de groupes sanguins ABH et Lewis [284] représentés **figure 29** (p.85). D'autre part, la polymérisation des unités N-acétyllactosaminiques $(3\text{-Gal-}\beta 1,4\text{-GlcNAc-}\beta 1)_n$ où $n = 1$ à 50, conduit à des structures glycaniques regroupées sous un terme générique commun à certains O-glycannes et glycolipides : les poly-lactosaminoglycannes [285] de forme linéaire (antigène i) ou branchée (antigène I) [286] représentés ci-après.

Comme les précédents N-glycannes de type complexe, les poly-lactosaminiques peuvent



exprimer les déterminants ABH et Lewis [287, 288], les résidus galactosyl terminaux peuvent être sialylés et la N-acétylglucosamine interne à l'unité de répétition peut être fucosylée pour donner naissance à des glycannes polyfucosylés [289].



Le dernier type de N-glycane résulte de la combinaison des structures de type oligomannosidique et N-acétyllactosaminique

précédentes ; c'est pourquoi ils sont nommés N-glycannes de type hybride (**figure 27**).

D.IV. LES O-GLYCANNES DE TYPE MUCINE

Ils correspondent aux structures O-glycanniques les plus répandues. Concernant les résidus monosaccharidiques les plus communément rencontrés dans ce type de glycane, en dehors du résidu N-acétylgalactosamine impliqué dans la liaison à la protéine, les

O-glycannes de type mucine renferment du galactose, de la N-acétylglucosamine, du fucose et différents acides sialiques. Des groupements sulfates peuvent en outre substituer le galactose et la N-acétylglucosamine, si bien qu'ils contribuent avec l'acide sialique à l'acidité de nombreux oligosaccharides de type mucine. Les chaînes O-glycanniques de type mucine se décomposent en trois régions distinctes [290] : 1) le noyau à proximité de l'axe peptidique ; 2) le squelette, région charnière linéaire ou branchée ; 3) la périphérie à l'extrémité de la chaîne glycannique, responsable de l'essentiel des variations structurales de ces glycannes.

D.IV.1. Les noyaux O-glycanniques

Tous les noyaux des O-glycannes de type mucine ont en commun la séquence GalNAc α -Ser/Thr (figure 28).

Le noyau de classe 1, Gal- β 1,3-GalNAc α -Ser/Thr, est le plus répandu [291]. Il constitue le déterminant antigénique T (antigène Thomsen-Friedenreich). Le noyau de classe 3 est peu fréquent. Les noyaux de classe 2 et 4 dérivent de la substitution des noyaux de classes 1 et 3 par un résidu de N-acétylglucosamine en β 1,6. Le noyau de classe 5 est rare puisqu'il n'a été isolé chez l'homme que dans les sécrétions intestinales fœtales [292] et l'adénocarcinome rectal [293]. Le noyau de classe 6 est lui aussi spécifique de l'homme. Le noyau de classe 7 n'a été localisé que dans les mucines gastriques humaines [294] et enfin le noyau de classe 8 est, quant à lui, spécifique des mucines sous-maxillaires bovines [295].

Il est parfois possible qu'un résidu d'acide sialique (NeuAc, NeuGc ou Kdn) puisse substituer l'unité commune

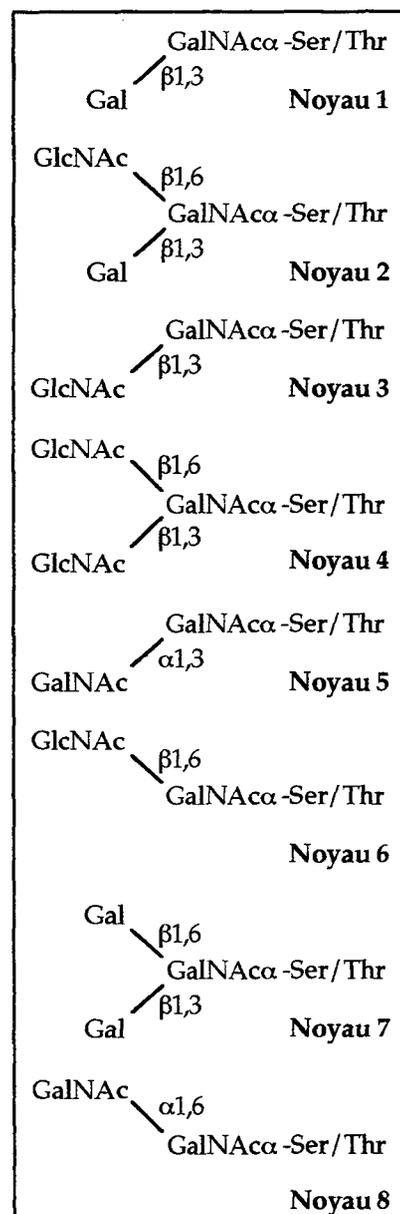


Figure 28 : Les noyaux O-glycanniques de type mucine (selon Schachter et Williams : [296]).

GalNAc α -Ser/Thr sous l'action d'une α 2,6-sialyltransférase [297], bloquant alors la formation des noyaux 1 et 3. De plus, des séquences polysialylées peuvent être formées à partir de ce nouveau résidu.

D.IV.2. Le squelette des O-glycannes

L'addition de résidus de galactose et de N-acétylglucosamine sur les noyaux (à l'exception de celui de classe 8) conduit à la formation du squelette des O-glycannes réparti en deux séquences : 1) Gal- β 1,3-GlcNAc de type 1 ou lacto ; 2) Gal- β 1,4-GlcNAc de type 2 ou néolacto. Ces séquences peuvent être répétitives ou former des ramifications.

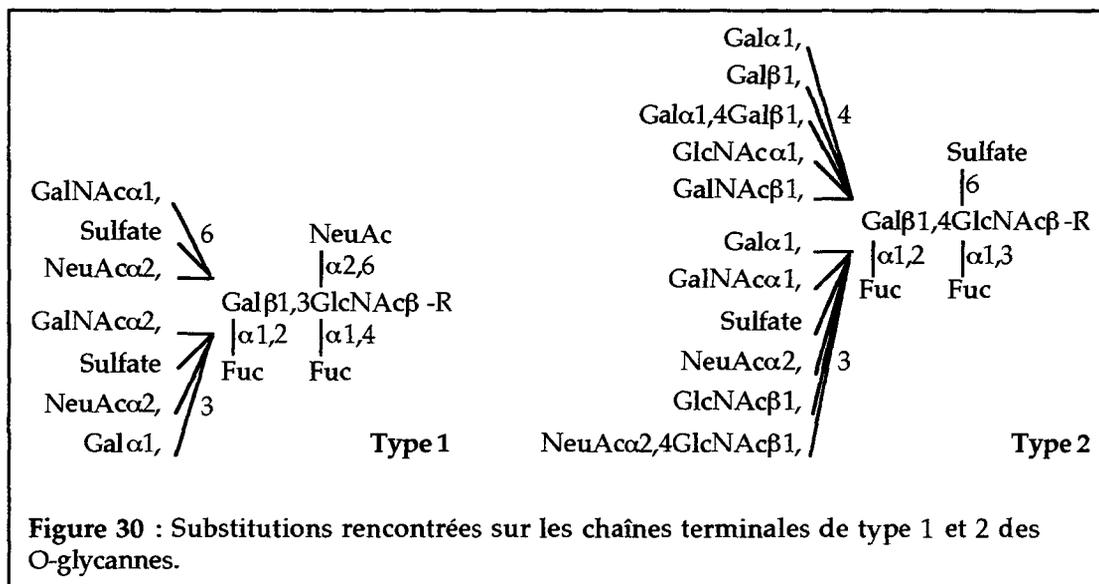
Il est à noter que cette règle de substitution par les disaccharides de type 1 ou 2 n'est pas générale, puisque certains font exception et ne sont formés que par un unique résidu de N-acétylglucosamine lié en β 1,3 ou β 1,6 au galactose des noyaux de classe 1 [298] ou 2 [299].

D.IV.3. La périphérie des O-glycannes

Les substitutions des unités du squelette des O-glycannes sont pour la plupart similaires à celles retrouvées sur les antennes des N-glycannes de type complexe ou dans certains glycolipides (antigènes de groupes sanguins ABH et Lewis [300]) (figure 29). De même, de nombreuses autres substitutions plus ou moins fréquentes ont été décrites et sont regroupées figure 30 (p.86).

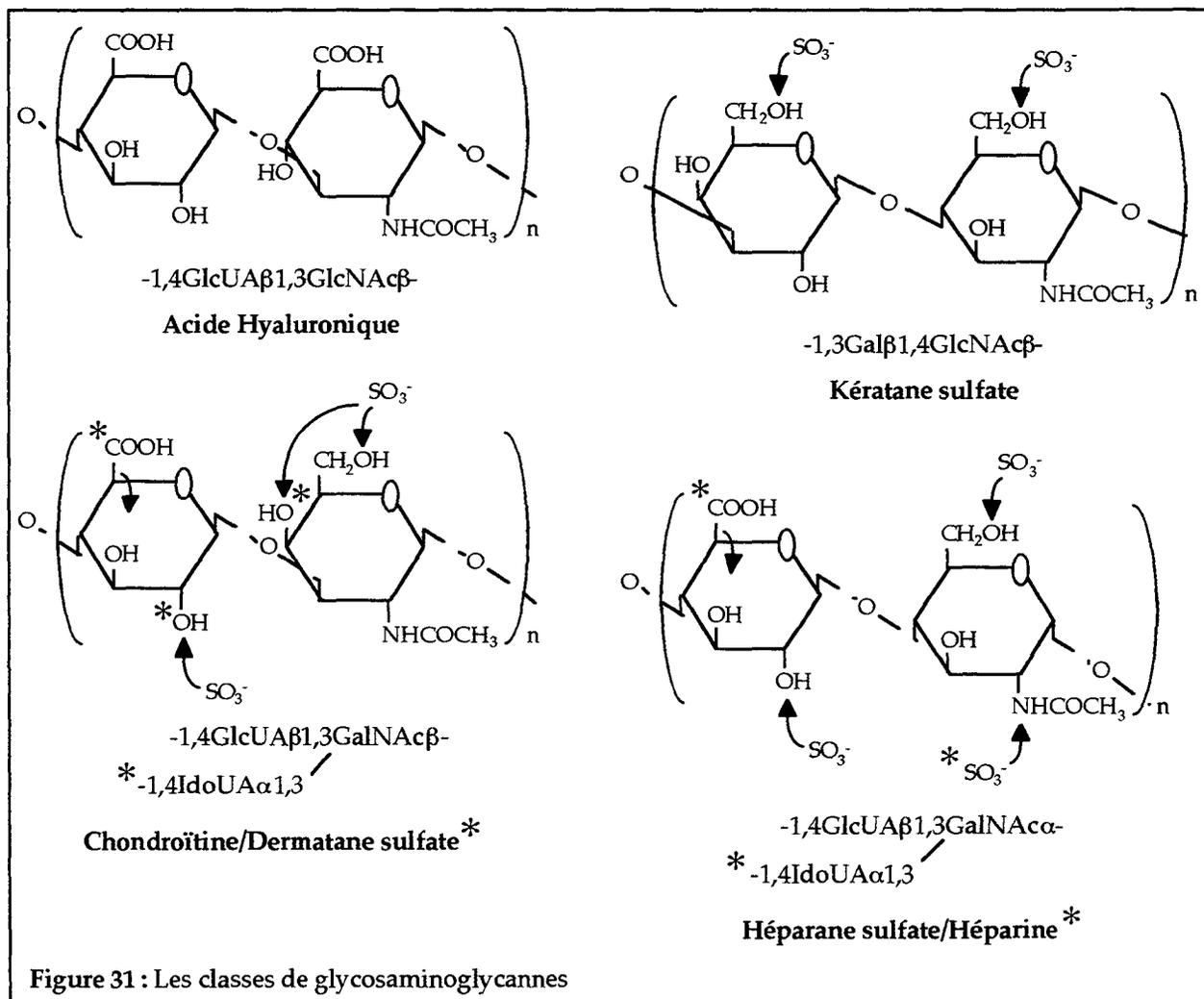
Gal β 1,3GlcNAc β -R α 1,2 Fuc Antigène H	GalNAc α 1,3Gal β 1,3GlcNAc β -R α 1,2 Fuc Antigène A
	Gal α 1,3Gal β 1,3GlcNAc β -R α 1,2 Fuc Antigène B
Gal β 1,3GlcNAc β -R α 1,4 Fuc Antigène Le^a	Gal β 1,3GlcNAc β -R α 1,2 α 1,4 Fuc Fuc Antigène Le^b
Gal β 1,4GlcNAc β -R α 1,3 Fuc Antigène Le^x	Gal β 1,4GlcNAc β -R α 1,2 α 1,3 Fuc Fuc Antigène Le^y

Figure 29 : Antigènes des groupes sanguins ABH et Lewis



D.V. CAS PARTICULIER DES GLYCOSAMINOGLYCANNES ET DES PROTEOGLYCANNES

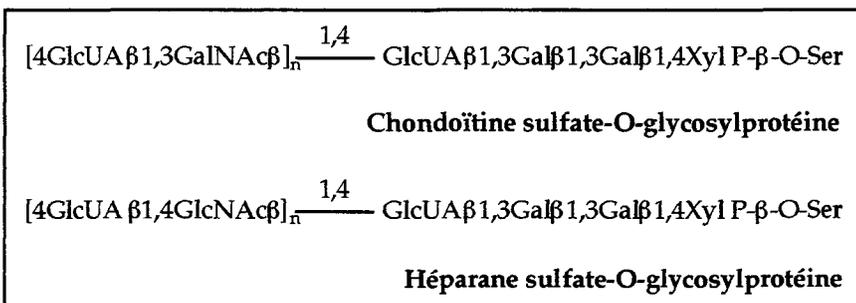
Parmi la multitude de substitutions évoquées pour les O- et N-glycannes, certaines sont communes aux deux types de glycosylation. C'est également le cas pour les unités de répétition disaccharidique des chaînes de glycosaminoglycannes des protéoglycannes [91].



Les glycosaminoglycannes sont des polymères de disaccharides formés de l'enchaînement d'une hexosamine et d'un hexose carboxylé et/ou sulfaté. On distingue 4 classes de glycosaminoglycannes (figure 31 p.86).

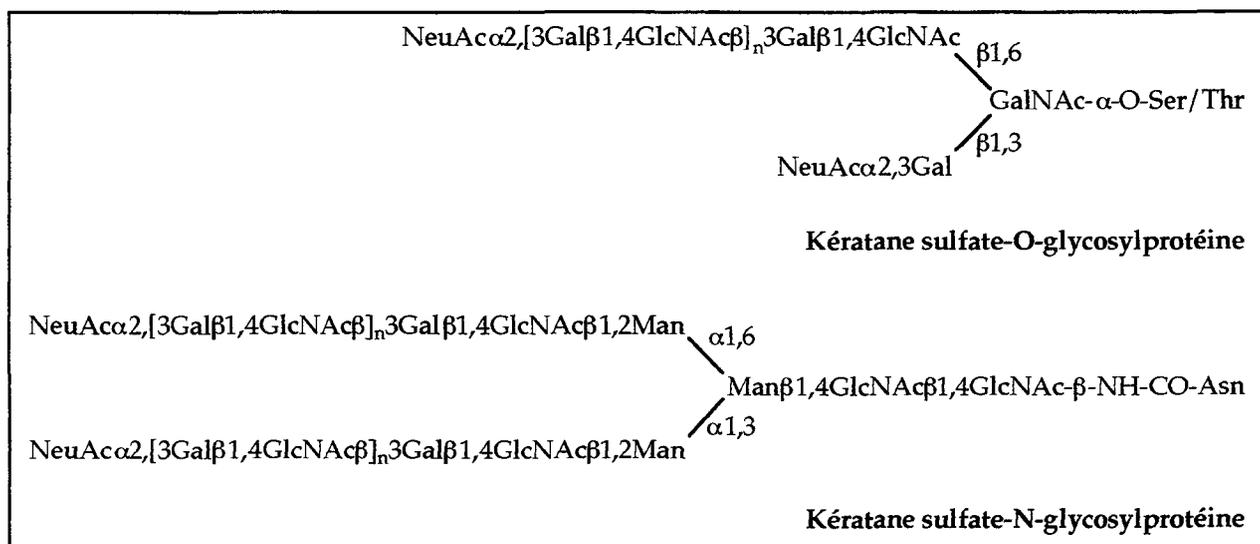
Les liaisons reliant ces glycosaminoglycannes sur les O- ou N-glycannes sont relativement spécifiques et on attribue : 1) au chondroïtine sulfate/dermatane sulfate et à l'héparane sulfate une structure tétrasaccharidique glucuronosyl-β1,3-galactosyl-β1,3-galactosyl-β1,4-xylosyl liée par un pont β-glycoside sur l'hydroxyl d'une sérine (représentation ci-

contre) ; 2) au kératane sulfate les structures O-glycanniques et N-glycanniques décrites ci-dessous.



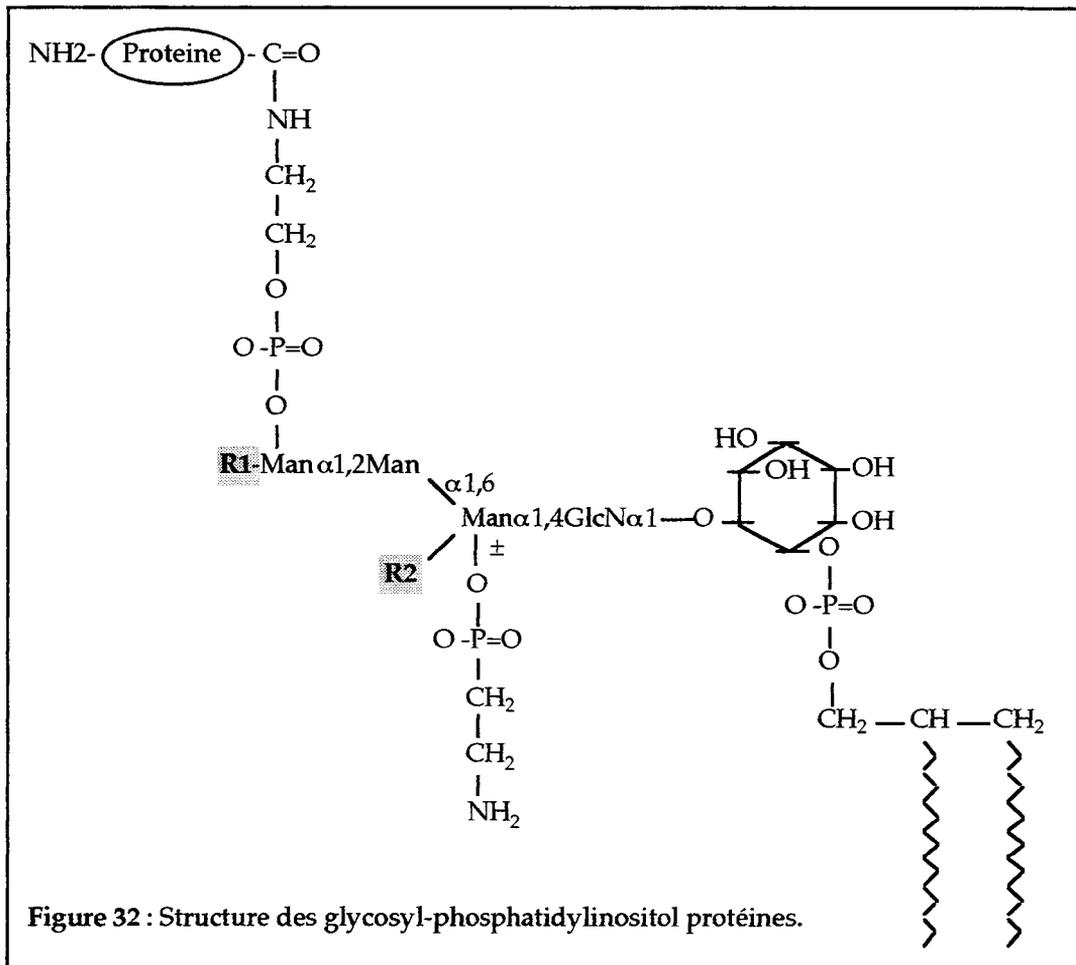
L'acide hyaluronique est un

cas particulier de glycosaminoglycane puisqu'il ne se lie pas de façon covalente à une chaîne glycannique d'une glycoprotéine, et n'appartient donc pas au sens strict à la famille des protéoglycannes.



D. VI. LES GLYCOSYL-PHOSPHATIDYLINOSITOL-PROTEINES (GPI- PROTEINE)

On a retrouvé dans les membranes des cellules des eucaryotes un nouveau type de glycoconjugué dont la structure est décrite figure 32 (p.88) [301].



Le noyau glycanique commun correspond à un tétrasaccharide Man- α 1,2-Man- α 1,6-Man- α 1,4-GlcNH₂- α dont la glucosamine a la particularité d'être non substituée par un groupement acétyle, comme c'est le cas dans la majorité des glycoprotéines. Ce noyau tétrasaccharidique est lié par son extrémité terminale non réductrice à un pont d'éthanolamine phosphate reliant la protéine. L'extrémité terminale réductrice est attachée à un mono ou di-acyl-phosphatidylinositol ancré dans la couche lipidique membranaire en surface de la cellule.

Ces molécules diffèrent par la nature et le nombre de phospho-éthanolamine et de monosaccharides substituant le noyau tétrasaccharidique commun. Il existe enfin des variations considérables concernant la nature des acides gras des phospholipides de ces GPI-protéines.

D.VII. CONCLUSION

La synthèse des chaînes glycaniques des glycoprotéines est le résultat de modifications post-traductionnelles faisant intervenir de nombreux enzymes (glycosyltransférases) de façon séquentielle. L'hétérogénéité structurale des monosaccharides des glycoprotéines n'est donc plus envisagée comme le résultat d'un arrangement aléatoire. Il s'avère effectivement que la glycosylation dépend à la fois de l'environnement de la protéine, du type ainsi que de l'état physiologique de l'organisme et du tissu ou de la cellule dans lesquels la glycoprotéine est synthétisée.

Enfin, les fonctions attribuées aux chaînes glycaniques des glycoprotéines sont désormais multiples (**tableau 8**), même si chaque glycoprotéine doit être considérée individuellement avant d'évaluer la contribution des carbohydrates aux fonctions et aux propriétés de la protéine.

Rôles

Physico-chimique	Modification de la solubilité, de la charge électrique, de la masse, de la taille et de la viscosité en solution
	Contrôle du repliement de la protéine
	Stabilisation de la conformation de la protéine
	Stabilisation thermique et protection contre les protéolyses
Biologique	Régulation du trafic et de la localisation intracellulaire des glycoprotéines
	Détermination de la durée de vie des glycoprotéines dans la circulation
	Modification des propriétés immunologiques
	Modulation de l'activité des enzymes et des hormones
	Acteurs des récepteurs de surface cellulaire pour des lectines, des antibiotiques, des toxines, ...
Participation aux interactions cellule-cellule	

Tableau 8 : Rôles majeurs des glycannes des glycoprotéines

Procédures expérimentales

CARACTERISATION BIOCHIMIQUE DE LA PREPARATION INDUSTRIELLE OHC

A.I. ANALYSE PROTEIQUE

La préparation « ossein hydroxyapatite complex » (OHC) nous est fournie par les industries pharmaceutiques PIERRE FABRE MEDICAMENTS. Cette matrice est le résultat d'un broyage initial de fémurs d'origine bovine. Puis, après traitement à l'acétone, l'extrait est lyophilisé.

A.I.1. Méthode de dosage des protéines selon Lowry modifiée [302]

Etant donné le caractère insoluble de l'OHC, les méthodes classiques de dosage des protéines (selon Bradford, Lowry ou au Biuret) s'avèrent inefficaces. Aussi, nous avons eu recours à une méthode modifiée de dosage selon Lowry.

Le dosage est réalisé en dix exemplaires sur le lot OHC OpFT 1172L, par deux personnes, le même jour, à l'aide de micropipettes calibrées, et dans des conditions de température et de temps d'incubations variables. 1mg de sérum albumine bovine (SAB) et 50mg d'OHC sont solubilisés séparément dans 1mL d'une solution de NaOH 0,5M, SDS 0,2%. Les deux solutions sont chauffées à 50°C, 100°C et 125°C pendant 5, 10, 15 et 30 minutes. Les tubes sont agités toutes les 5 minutes puis, après refroidissement, centrifugés 10 minutes à 5000g. A partir des solutions mères de SAB et d'OHC, on réalise les dilutions suivantes :

SAB ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	0	10	25	50	75	100	200	300	500	750	1000
OHC ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	0	10	25	50	75	100	200	300	500	750	1000
OHC ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	0	1	2	3	4	5	6	7	8	10	25
OHC (mg/mL)	0	0,1	0,5	1	2	3	5	10	20	50	100

2,5mL de réactif (Na_2CO_3 5% + 1/25 (v/v) CuSO_4 5% dans 1% de tartrate double Na^+/K^+) sont alors ajoutés et les tubes sont laissés 10 minutes sous agitation, avant l'addition de 0,5mL de Folin dilué au demi. Après une nouvelle agitation de chacun des tubes durant 30 minutes, la mesure de l'absorbance à 750nm permet de déterminer la concentration protéique du lot OHC (en se rapportant aux valeurs obtenues pour la SAB).

A.I.2. Profil électrophorétique sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE) des protéines de l'OHC

Les migrations électrophorétiques des protéines sont réalisées selon le système de Laemmli en conditions réductrices (ou non réductrices) [303].

Les échantillons (30 μ g) sont solubilisés dans un tampon Tris-SDS pH8.6 contenant 2,5% de 2- β -mercaptoéthanol (agent réducteur), puis chauffés à 100°C pendant 3 minutes. Le matériel soluble est déposé sur un gel de polyacrylamide linéaire 4-20% (1,5mm d'épaisseur). Après une migration de 3 heures à 40mA (Mini-gels pour Mini-protean II-BIO-RAD) dans le tampon Tris-HCl 25mM, Glycine 200mM, SDS 10%, pH8.0, le gel de polyacrylamide est soit coloré par une solution de bleu de Coomassie R-250 (Sigma) à 2,5% dans 33% de méthanol et 33% d'acide acétique, puis décoloré par le solvant méthanol 30%, acide acétique 7,5%, soit coloré au nitrate d'argent selon le procédé établi par Merrill [304]: après fixation des protéines 20 minutes dans une solution de méthanol 50%, acide acétique 12% ; l'excès de sodium lauryl sulfate (SDS) est rincé 3 fois par 200mL d'éthanol 10%, acide acétique 5% pendant 10 minutes ; le gel est alors placé 5 minutes dans une solution de dichromate de potassium 3.4mM, acide nitrique 0,0032N, puis lavé 4 fois 30 secondes par de l'eau avant d'être mis en présence d'une solution de nitrate d'argent 12mM pendant 30 minutes ; la révélation est réalisée par une solution fraîche de carbonate de sodium 280mM (300mL) contenant 500 μ L de formalin ; la révélation est stoppée par de l'acide acétique à 1% lorsque l'intensité de coloration est jugée suffisante.

A.I.3. Electrophorèse bidimensionnelle sur gel de polyacrylamide (IEF, SDS-PAGE) des protéines non collagène de l'OHC

Les électrophorèses bidimensionnelles sont réalisées selon la méthode initialement décrite par Anderson [305].

Préparation de l'échantillon - Digestion à la chondroïtinase ABC (Sigma) - Dessalage par CLHP-PR

Les protéoglycannes sont des protéines de haut poids moléculaire qui ne migrent pas dans le gel de polyacrylamide de seconde dimension (10%) et gênent globalement la

migration des autres protéines. La digestion par la chondroïtinase ABC (Sigma) est réalisée à 37°C pendant 15 heures sur 5mg (0,1 unité/2,5mg de protéines) de la fraction OHC OpFT 1172L (B) dans le tampon Tris-HCl 100mM pH8.2.

D'autre part, préalablement à l'isoélectrofocalisation, l'échantillon protéique est dessalé par chromatographie liquide haute performance en phase réverse sur colonne de C₈ (Alltech ; macrosphère RP300 250*4,6cm). 5mg d'échantillon sont mis en solution dans 500µL d'acétonitrile à 5%, acide trifluoroacétique 0,1% et injectés sur la colonne (100µL). Après 10 minutes d'élution avec la solution de reprise (1mL/min), les protéines sont désorbées par une solution d'acétonitrile 75%, acide trifluoroacétique 0,08%.

Isoélectrofocalisation - Electrophorèse en gel de polyacrylamide (SDS-PAGE 10%)

1mg d'extrait protéique lyophilisé et dessalé (protéines non collagènes (B) obtenues par déminéralisation du lot OHC OpFT 1172L) sont dissous dans 100µL de tampon de dissociation urée 9.5%, Nonidet P40 0.8%, β-mercaptoéthanol 10%, pH9.5. Après chauffage 3 minutes à 100°C, la solution est diluée par 100µL du même tampon de dissociation contenant les ampholytes (pI 3-10 et 4-8 ; 2%). Une étape nécessaire de pré-focalisation du gel (urée 9,5M, acrylamide 3%, bis-acrylamide 0.22%, Triton X100 2%, CHAPS 0.3%, ampholytes 2%) est effectuée durant 2 heures (1500V ; 110µA) dans les tampons cathode (soude 10N) et anode (acide phosphorique 85%). 30 à 40µL d'échantillon contenant des témoins de migration sont alors déposés sur le gel, puis couverts par 30µL de tampon urée 0.5M, Nonidet P40 0.2%, ampholytes 0,1%, dithiothréitol (DTT) 50mM. La migration dure 17 heures (20000 V/h ; 110µA). Après démoulage à 4°C, les gels sont placés 5 minutes dans un tampon d'équilibration Tris 300mM, Tris-HCl 75mM, SDS 3%, DTT 50mM, bleu de bromophénol 0.01%. La seconde dimension est réalisée dans un gel de polyacrylamide à 10% contenant du SDS. La migration dure 5 heures (500V) dans les tampons glycolle 200mM, Tris 25mM, SDS 0.1% (anode) et glycolle 400mM, Tris 50mM, SDS 0.2% (cathode).

Révélation du gel de seconde dimension

Les gels sont révélés au nitrate d'argent après fixation 12 heures dans une solution de méthanol 50%, acide acétique 10%. Après 3 lavages à l'eau (3*30min) sous agitation, réduction 30 minutes au DTT 32 μ M, incubation 90 minutes au nitrate d'argent 0,3% et 2 nouveaux rinçages rapides à l'eau (2min), la révélation est réalisée par une solution de carbonate de sodium 3%, formaldéhyde 0,16%. La révélation est stoppée à l'acide acétique 3%. Les gels sont conservés dans l'eau à 4°C.

A.I.4. Méthode de dosage des acides aminés par chromatographie liquide haute performance (CLHP)

25 μ g d'échantillon sont séchés sous vide puis hydrolysés sous vapeur d'acide chlorhydrique à 110°C durant 20 heures. L'acide chlorhydrique résiduel est évaporé et le culot est repris par 20 μ l d'une solution de triéthylamine/méthanol/eau 1/2/2 (v/v). Après séchage sous vide, l'échantillon est dérivé au phénylisothiocyanate (PITC ; PIERCE) par une solution de méthanol/eau/PITC/triéthylamine 7/1/1/1(v/v) et laissé 20 minutes au repos à température ambiante. Suite à un nouveau séchage sous vide, l'échantillon est

repris par 500 μ L d'une solution de Na₂HPO₄ 500mM pH7.4, acétonitrile à 5%. L'analyse est effectuée par injection de 10 μ L de la préparation sur une colonne PicoTag à 47°C. L'élution en chromatographie liquide haute performance est réalisée par le gradient ci-contre à 1mL/min.

t (min)	A %	B %
0	100	0
8	60	40
17	0	100
19	0	100

A : tampon acétate de sodium 100mM pH6.4 contenant 150 μ L de triéthylamine par litre de tampon
B : acétonitrile à 60%

A.II. ANALYSE LIPIDIQUE

Bien que l'OHC soit le résultat du broyage d'un fémur bovin traité à l'acétone, on procède à une extraction des gangliosides résiduels de la fraction (B) et d'un extrait de moelle osseuse (100g) selon le schéma décrit par Zanetta [306]. Brièvement, l'échantillon est repris dans un volume d'eau et centrifugé à 2000g pendant 5 minutes. Le culot est mis en suspension dans une solution (300mL) de méthanol/chloroforme 2/1 (v/v) puis

évaporé à sec. L'extrait est alors repris par une nouvelle solution (300mL) de méthanol/chloroforme 1/2 (v/v), concentrée par évaporation à 50mL puis diluée dans 20 volumes de chloroforme et 16 volumes de KCl 0,88%. Après 5 minutes sous agitation, on extrait la phase supérieure aqueuse enrichie en glycolipides. Cette dernière est concentrée puis dessalée par gel-filtration sur une colonne de Sephadex LH60 (2*30cm ; Pharmacia) équilibrée et éluée par une solution de méthanol/chloroforme 1/1 (v/v). La phase inférieure chloroformique enrichie en triglycérides, cholestérol, phospholipides ou en certains glycolipides neutres est concentrée puis déposée sur une colonne de silice équilibrée dans du chloroforme. L'élution est menée par du chloroforme (extraction du cholestérol) puis par une solution de méthanol/chloroforme 1/1. L'éluat est évaporé à sec. La présence résiduelle de cholestérol oblige à une précipitation à l'acétone où l'extrait sec est repris dans 1 volume de méthanol/chloroforme 1/1 et 10 volumes d'acétone. Après une nuit à 4°C, le précipité est remis en suspension dans du méthanol/chloroforme 1/1 et déposé sur une nouvelle colonne de silice. L'éluat (méthanol/chloroforme 1/1) est concentré puis conservé. Chaque fraction est analysée par chromatographie sur couche mince de silice (Silica gel 60, Merck) et migration dans le solvant acétate de méthyle/n-propanol/méthanol/chloroforme/KCl à 0,25% dans l'eau 25/20/20/20/17 (v/v). La couche mince est révélée par pulvérisation d'une solution d'orcinol sulfurique à 0,5% dans de l'acide sulfurique 3M, puis par chauffage à 130°C pendant 3 à 5 minutes.

L'analyse glucidique de chacun des glycolipides isolé par chromatographie sur couche mince préparative est réalisée par chromatographie en phase gazeuse (p.108).

A.III. ANALYSE GLUCIDIQUE

La composition glucidique globale est effectuée par identification et quantification par chromatographie en phase gazeuse de monosaccharides libérés après méthanolyse puis dérivation. La présence importante de sels dans les préparations industrielles d'OHC ne permet pas une telle analyse par chromatographie en phase gazeuse. Ainsi, la

méthanolyse est effectuée sur la fraction (B) obtenue par déminéralisation de l'OHC (p.96). Les résultats de ces analyses seront exposés dans le chapitre « Etude de la glycosylation des protéines de l'OHC » (p.145).

Par contre, la méthode de dosage des acides uroniques décrite par Blumenkrantz [307] est réalisable sur la poudre brute d'OHC selon le protocole suivant. 200 μ g d'échantillon d'OHC sont solubilisés dans 1,2mL d'une solution d'acide sulfurique concentré, tétraborate 12,5mM. Les tubes sont réfrigérés dans de la glace, agités puis chauffés à 100°C pendant 5 minutes. Après un nouveau refroidissement à 0°C, 20 μ L d'une solution de m-hydroxydiphényl 0,15%, soude 0,5% sont additionnés aux échantillons et placés sous agitation. Une mesure de l'absorbance est effectuée à 520nm et la concentration en acides uroniques est déterminée graphiquement en se rapportant aux valeurs d'absorbances obtenues pour la gamme de concentrations en acide glucuronique.

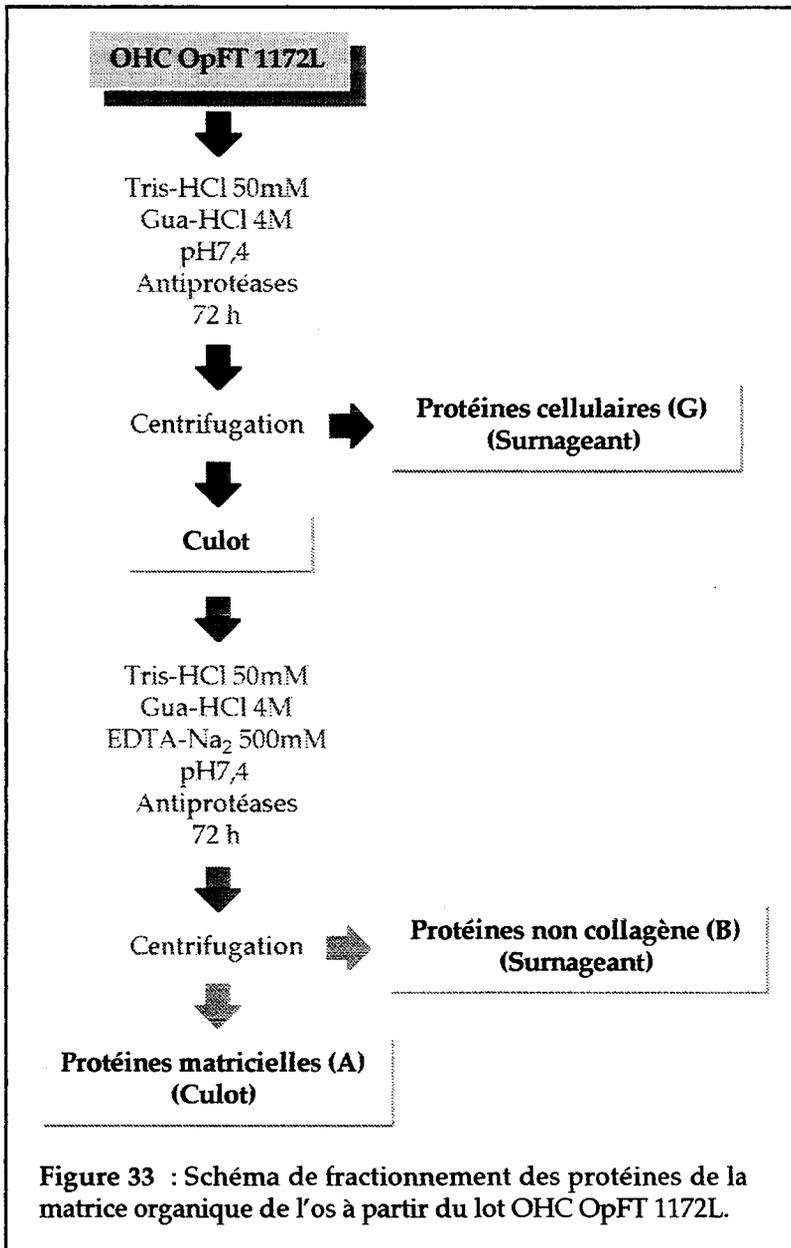
A.IV. DOSAGE DES SULFATES

50 μ g de la fraction protéique (B) du lot OpFT 1172L obtenue après dessalage par CLHP en phase réverse sur colonne de C₈ sont hydrolysés par 500 μ L d'une solution d'acide chlorhydrique 1M pendant 5 heures à 100°C. L'excès d'HCl est alors évaporé sous un flux d'azote et le résidu est repris par 200 μ L d'eau de qualité Milli-Q (Millipore Corp.) Le sulfate libéré est dosé par chromatographie liquide d'échange d'anions haute performance (CEAHP) selon le procédé décrit par Lo-Guidice [308].

B. MISE AU POINT D'UN PROCÉDÉ D'EXTRACTION DES PROTÉINES DE L'OHC

La poudre « ossein hydroxyapatite complex » est, comme son nom l'indique, un complexe mêlant la matrice organique riche en protéines et la matrice minérale phosphocalcique de l'os. Afin d'avoir accès aux protéines de la matrice organique, nous avons eu recours à une étape de déminéralisation de l'OHC, selon la méthode initialement décrite par Fisher [309].

100g d'OHC sont placés sous agitation à 4°C durant 72 heures dans 5L de tampon Tris-HCl



contre-dialyse (H₂O) est changé deux à trois fois par jour. Cette fraction correspond aux protéines cellulaires (G). L'étape de déminéralisation correspond à la remise en suspension du culot par 5L de tampon Tris-HCl 50mM, chlorhydrate de guanidine 4M, EDTA-Na₂ 500mM pH7,4, et en présence du cocktail d'antiprotéases précédent. Après une nouvelle centrifugation à 16000 g pendant 30 minutes, le surnageant protéique correspondant à la fraction enrichie en protéines non collagène (B) est précipité à l'acide trichloroacétique à 10% ou dialysé puis lyophilisé dans des conditions similaires à celles décrites précédemment. Le culot renfermant les protéines matricielles de type collagène (A) est dialysé puis lyophilisé.

50mM, chlorhydrate de guanidine 4M pH7,4, et en présence d'un cocktail d'antiprotéases composé de PMSF (20µg/mL), de leupeptine (0,5µg/mL), de pepstatine A (0,7µg/mL) et d'aprotinine (1µg/mL). Les étapes de purification sont dès lors réalisées à 4°C. Après centrifugation à 16000g pendant 30 minutes (rotor J.A. 10, 10000tr/min), le surnageant est précipité à l'acide trichloroacétique à 10%* ou dialysé en tubes à dialyse (seuil de coupure 6-8kDa) durant 48 heures puis lyophilisé. Le liquide de

Chacune de ces fractions (A), (B) et (G) est analysée en gel de polyacrylamide SDS-PAGE en présence et en absence d'agent réducteur (2- β -mercaptoéthanol).

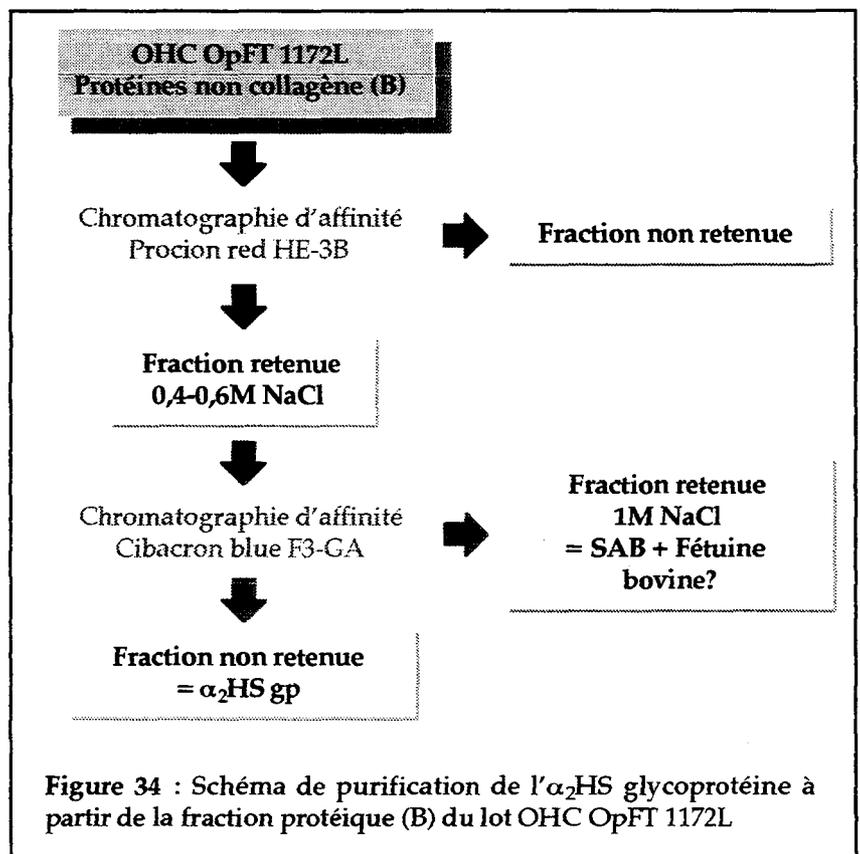
Le schéma de fractionnement des protéines de la matrice organique de l'os est représenté sur la **figure 33** (p.96).

*L'acide trichloroacétique à 10% entraîne la précipitation instantanée des protéines du surnageant. Une nouvelle centrifugation à 16000g pendant 10min permet l'obtention du culot protéique. Ce dernier, après trois lavages successifs à l'éthanol, est remis en suspension dans une solution tamponnée Tris-HCl 50mM pH7.4.

C. ISOLEMENT ET CARACTERISATION D'UNE PROTEINE MAJEURE : L'ALPHA 2 HS-GLYCOPROTEINE

Le but de l'étude était d'isoler et de caractériser l'une des protéines majeures représentative de l'OHC, pouvant être ultérieurement utilisée comme standard interne dans l'analyse comparative des différents lots.

Après extraction des protéines de la matrice organique de l'os, la fraction apparentée aux protéines non collagène (B) du lot OHC OpFT 1045L présentait un enrichissement significatif en protéines de masses moléculaires voisines de 55kDa. Les données de la littérature décrivaient l'une des protéines majeures de l'os comme étant l' α_2 HS



glycoprotéine (protéine d'origine plasmatique qui s'accumule dans la matrice organique de l'os) et présentant une masse moléculaire apparente de 55kDa en gel de polyacrylamide (SDS-PAGE en conditions non réductrices). Pour ces raisons, nous avons entrepris la purification de cette glycoprotéine à partir de la fraction (B).

Toutes les étapes de purification sont menées à 4°C et en présence du cocktail d'antiprotéases décrit précédemment, afin d'éviter toute dégradation du matériel protéique par la présence d'endoprotéases naturelles (**figure 34**).

C.I. CHROMATOGRAPHIE DE TAMISAGE MOLECULAIRE

50mg d'échantillon OHC (B) sont solubilisés dans 2mL de tampon Tris-HCl 50mM, chlorhydrate de guanidine 4M, pH7.4, puis déposés sur une double colonne (2,5*(180+180)cm) de Sepharose CL-6B (Pharmacia) équilibrée dans le tampon de reprise. Chaque fraction éluée (5mL/h) est observée en U.V. à 280nm, lavée puis concentrée par ultrafiltration (Millipore, filtres YM-10).

C.II. CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE SUR COLONNE DE SEPHAROSE CL-6B PROCION RED HE-3B (PHARMACIA)

10mg d'échantillon protéique sont solubilisés dans 2mL de tampon phosphate de sodium 50mM, pH5.8, puis déposés sur une colonne (1,2*40 cm) de Sepharose CL-6B Procion red HE-3B équilibrée dans ce tampon de reprise. L'élution (12mL/h) est réalisée par un gradient continu en NaCl (0-1M ; 250mL). Chaque fraction collectée est observée en U.V. à 280nm et les protéines sont précipitées à l'acide trichloroacétique à 10%.

C.III. CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE SUR COLONNE DE SEPHAROSE CL-6B CIBACRON BLUE F3-GA (PHARMACIA)

10mg d'échantillon protéique (fraction retenue sur Procion red HE-3B) sont solubilisés dans 1mL de tampon phosphate de sodium 50mM, pH7.0. Après dépôt sur colonne (1,2*40 cm) de Sepharose CL-6B Cibacron blue F3-GA équilibrée dans le tampon de reprise, les fractions sont éluées (12mL/h) par un gradient discontinu en NaCl (0 et 1M ; 150mL). Afin d'optimiser le fractionnement, la fraction non retenue est redéposée. Chacune des fractions observée en U.V. à 280nm est précipitée à l'acide trichloroacétique à 10%.

C.IV. IMMUNOREVELATION A L'AIDE DES ANTICORPS POLYCLONAUX ANTI-SERUM ALBUMINE BOVINE, ANTI-FETUINE BOVINE ET ANTI- α_2 HS GLYCOPROTEINE HUMAINE

10 à 20 μ g de chaque échantillon protéique sont solubilisés dans 20 μ L de tampon

Laemmli [303] puis déposés sur un gel de polyacrylamide à gradient de concentration 4-20%. Après migration électrophorétique, les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose (Schleicher et Schull 0,2 μ m BA83) pendant 2 heures à 100mA, dans le tampon Tris-HCl 20mM, glycoColle 150mM, méthanol 20%, pH8.3. La membrane est alors immédiatement mise en contact (12 heures) avec une solution de polyvinyl-pyrrolidone (PVP) à 2% dans le tampon phosphate de sodium 50mM, NaCl 150mM, pH7.4 (PBS). La membrane est ensuite lavée 15 minutes dans du PBS puis incubée 2 heures en présence d'une solution polyclonale d'immunoglobulines G de lapin (anti-fétuine bovine) ou de souris (anti-sérum albumine bovine) ou encore de chèvre (anti- α_2 HS glycoprotéine humaine). Une nouvelle série de lavages précède la seconde incubation par les anti-sérum de lapin, de souris ou de chèvre (marqués à la peroxydase). Après plusieurs lavages dans du PBS, la membrane est révélée à l'obscurité par une solution de PBS, 3,3'-diaminobenzidine-4,4'-tétrahydrochloride 0,1% (DAB), H₂O₂ 15%.



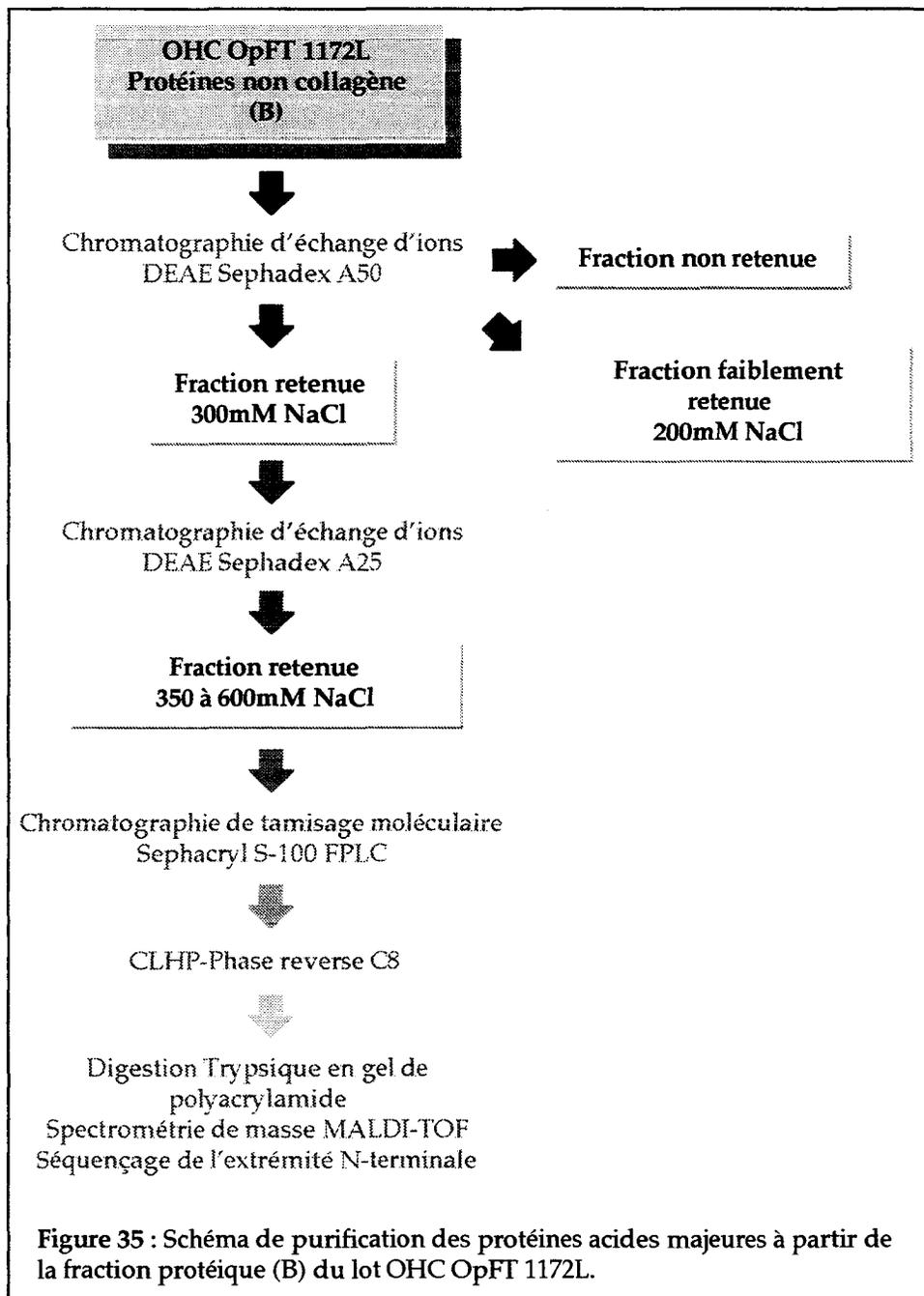
D. ISOLEMENT ET CARACTERISATION DES PROTEINES ACIDES : LES SIALO/PHOSPHOPROTEINES

Les différentes étapes de purification des protéines acides sont présentées sur la **figure 35** (p.100).

D.I. CHROMATOGRAPHIE D'ÉCHANGE D'ANIONS

La fraction protéique (B) du lot OHC OpFT 1172L est concentrée par ultrafiltration dans du tampon Tris 10mM, EDTA-Na₂ 20mM, pH7.4 (Millipore ; filtres YM-10). Dès lors, toutes les étapes de purification sont réalisées à 4°C, en présence du cocktail d'antiprotéases comme précédemment. Le concentré protéique est déposé sur une colonne d'échange d'anions de type DEAE-Sephadex A₅₀ (Pharmacia ; 2,5*20cm) en équilibre dans le tampon. La fraction non retenue est éluée par 200mL de ce tampon (20mL/h) puis concentrée par ultrafiltration (Millipore ; filtres YM-10). Une première fraction retenue est éluée par 200mL de tampon Tris 10mM, EDTA-Na₂ 20mM, NaCl

200mM, pH7.4. La seconde fraction retenue est éluée par 200mL de tampon Tris 10mM, EDTA-Na₂ 20mM, NaCl 300mM, pH7.4. Cette dernière fraction acide est alors amenée par dilution à une concentration en NaCl de 180mM.



Après concentration par ultrafiltration, le concentré est déposé sur une colonne d'échange d'anions de type DEAE-Sephadex A₂₅ (Pharmacia ; 2,5*10cm) en équilibre dans le tampon Tris 10mM, EDTA-Na₂ 20mM, NaCl 180mM, pH7.4. L'éluion (20mL/h) est réalisée par un gradient continu en NaCl (180-750mM) dans le tampon Tris 10mM EDTA-Na₂ 20mM

pH7.4 pendant 6 heures. Chaque fraction est observée en U.V. à 280nm, lavée puis concentrée par ultrafiltration dans un tampon Na₂CO₃ 50mM, NaCl 250mM, pH8.0.

D.II. CHROMATOGRAPHIE DE TAMISAGE MOLECULAIRE

Après concentration par ultrafiltration (Millipore ; filtres YM-10), les fractions d'intérêt retenues sur DEAE-A₂₅ sont déposées sur une colonne de tamisage moléculaire de type Sephacryl S-100 (Pharmacia ; 1*50cm) équilibrée dans le tampon NH₄HCO₃ 50mM, NaCl 250mM, pH8.0. L'élution par chromatographie liquide à débit rapide (FPLC) est réalisée à température ambiante à 60mL/h dans le même tampon. Chaque fraction est observée en U.V. à 280nm puis concentrée par ultrafiltration (Millipore ; filtres YM-10).

D.III. CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE EN PHASE REVERSE (CLHP-PR)

Le concentré est injecté (100µL) sur une colonne en phase réverse C₈ (Alltech ; macrosphère RP300 250*4,6mm) puis éluee (1mL/min) par un gradient continu acétonitrile/eau décrit ci-contre.

Chaque fraction est détectée en U.V. à 254nm, collectée puis lyophilisée.

t (min)	A%	B%
10	100	0
55	0	100
60	0	100
61	100	0
70	100	0

A : acétonitrile 5%, acide trifluoro-acétique 0,1%
B : acétonitrile 80%, acide trifluoro-acétique 0,08%

D.IV. DIGESTION TRYPSIQUE EN GEL DE POLYACRYLAMIDE ET ANALYSE DES PEPTIDES FORMES PAR SPECTROMETRIE DE MASSE EN MODE MALDI-TOF [310]

Les fractions protéiques obtenues par CLHP sur colonne en phase réverse de type C₈ sont déposées sur gel de polyacrylamide 4-20%. Après migration électrophorétique, le gel est révélé au nitrate d'argent selon le procédé établi par Merrill [304] (Silver stain Bio-Rad) spécifique des glycoprotéines et polysaccharides, ou révélé au bleu de Coomassie R-250 (Sigma). Les bandes sont découpées directement dans le gel de polyacrylamide et placées dans un tube Eppendorf à faible adsorption. La décoloration est effectuée à 30°C par une solution bicarbonate d'ammonium 200mM, acétonitrile 50%. Le surnageant est changé

toutes les 30 minutes jusqu'à décoloration totale du gel. Les bandes sont séchées sous un flux d'azote durant 30 minutes puis réhydratées successivement par 5 μ L d'une solution bicarbonate d'ammonium 200mM, tween 20 0,02%, contenant 0,5 μ g de trypsine (sequencing grade modified trypsin porcine ; Promega corporation), et 2*10 μ L d'une solution bicarbonate d'ammonium 200mM. La digestion dure une nuit à 30°C sous agitation. Les peptides sont extraits du gel par deux traitements en présence de 450 μ L d'une solution acétonitrile 60%, acide trifluoroacétique 0,1% sous agitation pendant 40 minutes. Les deux surnageants prélevés sont rassemblés puis réduits par évaporation rotative. L'échantillon résiduel est conservé à -20°C avant analyse par spectrométrie de masse en mode MALDI-TOF (p.109).

D.V. SEQUENCAGE DE L'EXTREMITÉ N-TERMINALE PAR DEGRADATION D'EDMAN

Les fractions protéiques obtenues par CLHP sur colonne en phase réverse de type C₈ sont déposées sur gel de polyacrylamide 4-20%. Après migration électrophorétique, les protéines sont transférées 12 heures à 10mA dans le tampon Tris-base 50mM, acide borique 50mM, pH8.0, sur une membrane de nitrocellulose de type Immobilon P (Millipore). Avant le transfert, la membrane est rincée dans du méthanol à 100% puis dans l'eau de qualité milliQ et équilibrée dans le tampon de transfert. Après le transfert, la membrane est lavée dans l'eau puis colorée à l'amido black (Sigma) durant 10 à 15 secondes (méthanol 45%, acide acétique 1%, amido black 0.1%). La membrane est une dernière fois rincée à l'eau puis séchée. Les bandes protéiques sont découpées et l'extrémité N-terminale peptidique est séquencée par dégradation d'Edman (séquenceur protéique automatique Procise 492 Perkin Elmer).

E. ETUDE DE LA STABILITE DE LA PREPARATION OHC EN FONCTION DU pH ET EN PRESENCE D'EXTRAITS GASTRIQUES ET DUODENAUX HUMAINS - PREPARATION D'UN ANTICORPS POLYCLONAL ANTI-OHC (B)

E.I. PROFILS ELECTROPHORETIQUES DES HYDROLYSATS CHIMIQUES, GASTRIQUES ET DUODENAUX

Dans le but d'évaluer la stabilité de la préparation industrielle OHC aux valeurs de pH proches de celles de l'appareil gastrique et du tube digestif, on réalise une étude

cinétique d'hydrolyse de l'OHC à 37°C, en présence de solutions tamponnées à pH1, 2, 4 et 7. Pour cela, 10 et 100mg du lot OHC OpFT 1130L sont placés en suspension dans 1mL d'une solution tampon 100mM (acide chlorhydrique pH1 ou acide formique pH2 ou acide acétique pH4 ou phosphate de sodium pH7) pendant 1, 2 et 4 heures à 37°C. Chacune des fractions est alors analysée par électrophorèse en gel de polyacrylamide 4-20% en présence de SDS et en condition non réductrice. La révélation est effectuée au bleu de Coomassie R-250 (Sigma).

Une étude semblable, mais en présence de 1mL d'extraits gastriques et duodénaux humains, est réalisée sur 10mg du même lot OHC OpFT 1130L pendant 30 minutes, 1, 2, 4 et 8 heures à 37°C. Chacune des fractions est, comme précédemment, analysée par électrophorèse en gel de polyacrylamide. Toutefois, étant donnée la présence de nombreuses protéines humaines dans les extraits gastriques et duodénaux, les révélations des protéines spécifiques de l'OHC ont nécessité la préparation d'un anticorps polyclonal anti-OHC (B).

E.II. PREPARATION DE L'ANTICORPS POLYCLONAL ANTI-OHC (B)

L'OHC est majoritairement constitué d'une matrice minérale phosphocalcique insoluble, non injectable. C'est pourquoi la fraction protéique (B) obtenue par déminéralisation du lot OHC OpFT 1130L est choisie pour la production des anticorps polyclonaux. Cependant, en raison de l'utilisation de sels d'EDTA- Na_2 dans le protocole d'extraction de cette fraction protéique (B), la recherche de la présence résiduelle de cet agent toxique dans la fraction (B) est réalisée par chromatographie en phase gazeuse. L'analyse du spectre obtenu a effectivement révélé la présence significative d'EDTA- Na_2 , même après dialyse et ultrafiltration de l'échantillon. Afin de purifier l'échantillon des sels d'EDTA- Na_2 , 100mg de la fraction OHC (B) sont déposés sur une colonne de Bio-gel P2 (Pharmacia ; 4*120cm) équilibrée dans une solution d'acide acétique à 1%. L'élution (15mL/h) est réalisée par cette même solution et les fractions révélées en U.V. à 280nm

sont rassemblées puis concentrées par ultrafiltration (Millipore ; filtres YM-10). Une nouvelle analyse par chromatographie en phase gazeuse a confirmé la présence de sels d'EDTA-Na₂ à l'état de traces (<1%).

2,5mg de la fraction OHC OpFT 1130L (B) dessalée sont placés en suspension dans 500µL de sérum physiologique injectable et 500µL d'adjuvant de Freund Difco (complet lors de la première injection, incomplet pour les suivantes). Les lapins sont de race néo-zélandaise, âgés de 6 mois. Le premier prélèvement est pratiqué à partir de la veine marginale de l'oreille avant la première injection et constitue un témoin négatif. Après 60 jours, 10 à 15mL de sang sont prélevés et laissés au repos 24 heures à 4°C. Deux rappels sont effectués, en alternance avec les prélèvements, tous les 15 jours. Les immunoglobulines G sont précipitées à 0°C et sous agitation, par addition goutte-à-goutte d'une solution saturée de sulfate d'ammonium pour atteindre 40% de concentration. Après centrifugation à 3000g pendant 15 minutes à 4°C, le culot est repris par 1mL de sulfate d'ammonium 40% puis, à nouveau centrifugé. Le nouveau culot est alors remis en suspension dans 1mL de tampon phosphate de sodium 50mM, NaCl 150mM, pH7.4 (PBS), puis concentré par ultrafiltration dans ce même tampon (Millipore ; filtres YM-30).

E.III. REVELATION DES PROTEINES SPECIFIQUES DE L'OHC PAR L'ANTICORPS POLYCLONAL ANTI-OHC (B)

Après migration électrophorétique en condition non réductrice des différentes fractions incubées en présence des extraits gastriques et duodénaux humains, les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose (p.98). Le blocage des sites non spécifiques sur la membrane est réalisé en présence d'une solution de polivinylpyrrolidone à 2% dans le PBS. Différents lavages au PBS sont nécessaires avant les deux heures d'incubation de la membrane en présence de la solution d'immunoglobulines G de lapin anti-OHC (B) à 0,1% dans le PBS. Une nouvelle série de lavages au PBS précède la seconde incubation par un anticorps anti-sérum de lapin marqué à la peroxydase à 0,08% dans le PBS. Enfin, après une dernière série de lavages, la révélation est effectuée à l'obscurité par addition d'une solution de PBS,

3,3'diaminobenzidine 4,4'tétrahydrochloride (DAB) 0,1%, H₂O₂ 15%.

F. ETUDE DE LA GLYCOSYLATION DES PROTEINES DE LA MATRICE ORGANIQUE DE L'OS

F.I. UTILISATION DE LECTINES POUR L'IDENTIFICATION DES GLYCANNES PRESENTS A LA SURFACE DES GLYCOPROTEINES

Les glycoprotéines migrent classiquement sur gel de polyacrylamide à gradient de concentration 4-20%, puis sont transférées sur membrane de nitrocellulose. Après blocage des sites non spécifiques par de la sérum albumine bovine à 3% dans le tampon phosphate de sodium 50mM, NaCl 150mM, pH7.4 (PBS), la membrane est lavée 3 fois 10 minutes dans du PBS contenant 0,1% de tween 20, puis 10 minutes dans une solution de PBS, CaCl₂ 1mM. La membrane est alors incubée 1 heure, sous agitation, en présence d'une solution lectinique (lectines conjuguées avec un haptène stéroïde : la digoxigénine) à 0,1% dans du PBS, CaCl₂ 1mM. Après 3 nouveaux lavages dans du PBS, la membrane est incubée 1 heure en présence d'immunoglobulines G anti-digoxigénine marquées à la phosphatase alcaline (0,1% dans le PBS). Une nouvelle série de lavages dans du PBS est nécessaire avant la révélation de la membrane par une solution Tris-HCl 100mM, MgCl₂ 50mM, NaCl 100mM, pH9.5, 4-nitro blue tetrazolium chloride (NBT) 0,5%, 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate (X-phosphate) 0,375%. La réaction est stoppée par rinçage à l'eau.

F.II. METHODE CHIMIQUE D'ISOLEMENT DES GLYCANNES - CARACTERISATION DES STRUCTURES GLYCANNIQUES MAJEURES

L'objectif de notre travail a consisté en la purification de structures glycaniques majeures, à partir de la fraction protéique (B) obtenue par déminéralisation du lot OHC OpFT 1172L. Le schéma de fractionnement et d'analyse de ces structures glycaniques est présenté **figure 36** (p.109).

F.II.1. Libération des O-glycannes et des N-glycannes

a) par β -élimination réductive

- 8g de la fraction OHC (B) du lot OpFT 1172L sont soumis à un mécanisme de β -

élimination alcaline douce par de la soude 100mM, pH12.5, à 45°C pendant 48 heures et en présence de borohydrure de sodium (BH_4K) 1M. La réaction est stoppée par addition d'acide acétique jusqu'à pH5. La solution est concentrée par évaporation rotative. L'acide borique en excès est éliminé par 3 lavages successifs au méthanol et distillation du méthylborate formé. L'échantillon résiduel est dessalé par tamisage moléculaire sur colonne de Bio-Gel P2 (Pharmacia) [311].

Dans ces conditions expérimentales, les O-glycannes sont libérés sous forme d'oligosaccharides alditols, les N-glycannes sont libérés soit sous forme de glycopeptides ou glyco-asparagines, soit sous forme d'oligosaccharides alditols libres.

- Une seconde méthode décrite par Likhosherstov [312] permet une libération plus spécifique des O-glycannes. 200mg de poudre osseuse sont solubilisés dans 141mL d'une solution de BH_4Na 2M, NaOH 27mM, et 9mL d'une solution d'EDTA- Na_2 6mM, acétate de cadmium 6mM ajustée à pH7-7.5 par de la soude 500mM. La solution est placée 16h à 50°C après un nouvel ajustement du pH à 12.5 par de la soude concentrée. La réaction est stoppée par addition d'acide acétique jusqu'à pH5. La solution est filtrée puis concentrée par évaporation rotative. L'acide borique en excès est éliminé par 3 lavages successifs au méthanol et distillation du méthylborate formé. L'échantillon est, comme précédemment, dessalé par tamisage moléculaire sur colonne de Bio-Gel P2.

b) par hydrazinolyse [313]

Les glycoprotéines lyophilisées sont placées avec précaution en présence d'une quantité minimale et suffisante d'hydrazine anhydre (Pierce Chemical Co, Rockford, IL, USA) pour couvrir l'échantillon. Ce dernier est laissé 24h à 100°C. L'excès d'hydrazine est éliminé par évaporations répétées en présence de toluène, sous un flux d'azote. Le matériel est alors purifié par tamisage moléculaire sur colonne de Bio-Gel P2 (2*40cm).

Les oligosaccharides libérés sont alors N-réacétylés. 1 à 2mL d'une solution de bicarbonate de sodium saturée puis 50 μL (par mg d'oligosaccharides) d'anhydride acétique sont

additionnés à raison de 10 μ L toutes les 15min. La réaction est stoppée par acidification en présence de résine échangeur d'ions de type Dowex 50x8 (25-50mesh, forme H⁺) jusqu'à pH7.0. Après filtration et lyophilisation, l'échantillon est dessalé par tamisage moléculaire sur colonne de Bio-Gel P2 puis lyophilisé.

F.II.2 Hydrolyse protéolytique par la Pronase E

L'utilisation de Pronase E, qui est une mixture d'endopeptidases, permet l'obtention de glycoamino-acides ou de glycopeptides à chaîne polypeptidique courte. 100mg de glycoprotéine sont solubilisés dans 10mL d'acétate de sodium 10mM contenant 2mg de Pronase E (Merck). La mixture est laissée 24h à 37°C. Après 4h, 8h et 20h d'hydrolyse, la même quantité de Pronase E est additionnée et le pH est maintenu à 8.0 par addition de NaOH 100mM. La réaction est stoppée par acidification à pH4.5 par de l'acide acétique dilué. La solution est concentrée à 5mL et les peptides résiduels sont précipités par 1 volume d'éthanol. Le surnageant glycopeptidique est dessalé par tamisage moléculaire sur colonne de Bio-Gel P2, puis lyophilisé.

F.II.3. Purification de la fraction neutre et des fractions acides

Le matériel est, dans un premier temps, dessalé par gel-filtration sur colonne de Bio-Gel P2 (Pharmacia; 5*120cm, 400 mesh) en équilibre dans l'eau désionisée. Après repérage du matériel glucidique par pulvérisation sur couche mince (Silica gel 60 ; Merck) d'orcinol à 0,2% dans une solution d'acide sulfurique à 20% et chauffage à 100°C, les fractions révélées sont rassemblées et concentrées. Le concentré est alors déposé sur une double colonne d'échange d'ions de type Dowex 50*2 et Dowex 1*2 (3*40cm, 200-400mesh ; Bio-Rad). L'élution par l'eau permet l'obtention d'une fraction oligosaccharidique neutre. L'élution à 200mM en acétate de pyridine de la résine d'échange de cations (Dowex 50*2) n'a pas permis l'obtention de matériel glucidique susceptible d'intéresser la suite de nos travaux. A l'inverse, l'élution par un gradient discontinu en acétate de pyridine (5, 10, 15, 20, 50, 100, 200, 500, 1000 et 2000mM) a permis l'obtention de fractions oligosaccharidiques acides. Chacune de ces fractions acides est dessalée sur colonne de Bio-Gel P2 (1,5*100cm,

400 mesh ; Pharmacia).

L'hétérogénéité en oligosaccharides de chacune des fractions neutres et acides est estimée par chromatographie sur couche mince (Silica gel 60 ; Merck) après migration 5 heures dans le solvant butanol/acide acétique/eau 2/1/1,5 (v/v) et révélation à l'orcinol sulfurique. Un premier fractionnement des oligosaccharides en fonction de leur taille est réalisé par gel-filtration sur colonne de Bio-Gel P4 (1,5*100cm, 400 mesh ; Pharmacia).

La purification finale des oligosaccharides est réalisée par chromatographie sur couche mince préparative (Silica gel 60 0,2mm, support en verre, Merck). Une double migration dans le solvant butanol/acide acétique/eau 2/1/1,5 (v/v) est nécessaire pour l'optimisation du fractionnement. Après prélèvement de la couche superficielle de silice, le matériel glucidique est récupéré par élution dans l'eau et centrifugation 5 minutes à 2000g. Un nouveau contrôle des fractions ainsi séparées est effectué par chromatographie sur couche mince.

F.II.4. Analyse des monosaccharides par chromatographie en phase gazeuse (CPG)

La méthanolyse est une étape indispensable à la détermination, par CPG, du contenu en monosaccharides des chaînes oligosaccharidiques complexes. 2 μ g d'échantillon lyophilisé et 1 μ g de méso-inositol (standard interne) sont hydrolysés (dans un tube à capsule de fermeture en Téflon) par 200 μ L de méthanol-HCL 0,5M à 80°C pendant 24 heures. Après neutralisation de la solution au carbonate d'argent jusqu'à pH 6-7 puis centrifugation 5 minutes à 2000g, les O-méthylglycosides formés sont N-réacétylés une nuit à température ambiante par addition de 10 μ L d'anhydride acétique. Le surnageant est prélevé suite à une nouvelle centrifugation 5 minutes à 2000g. Puis, dans le but d'éliminer les esters méthylés d'acides gras, la phase méthanolique est lavée 2 fois par 200 μ L d'heptane. La phase méthanolique est alors séchée par un flux d'azote et les résidus secs sont dérivés par triméthylsilylation pendant 1 heure à température ambiante, par addition de 20 μ L de bis-silyltrifluoro-acétamide (BSTFA) en présence de 10 μ L de pyridine.

L'analyse par chromatographie en phase gazeuse est réalisée sur $1\mu\text{L}$ du mélange de méthylglycosides triméthylsilylés injecté sur une colonne capillaire de silicane OV101 ($25 \times 0,33\text{mm}$). Le chromatographe est muni d'un détecteur à ionisation de flamme (température à 250°C) et d'un injecteur en verre (240°C). L'hélium est le gaz vecteur appliqué à la pression de $0,5\text{bar}$. Le programme de température s'échelonne de 120°C à 240°C ($2^\circ\text{C}/\text{min}$).

F.II.5. Analyse des oligosaccharides par spectrométrie de masse (MALDI-TOF)

La spectrométrie de masse par désorption laser assistée par une matrice et associée à un temps de vol (MALDI-TOF) est une méthode analytique de choix pour la détermination précise de la masse moléculaire d'oligosaccharides, de glycopeptides ou même de protéines ou glycoprotéines.

Dans un tube en verre, les oligosaccharides sont solubilisés dans l'eau à la concentration de $100\mu\text{g}/\text{mL}$. L'échantillon est alors mélangé ($1/5$ (v/v)) avec une matrice, constituée d'une solution d'acide 2,5-dihydroxy-benzoïque ($10\mu\text{g}/\text{mL}$ d'éthanol à 10%) UV 337nm nitrogen laser. $0,5\mu\text{L}$ à $1\mu\text{L}$ du mélange matrice-échantillon est alors appliqué sur la cible métallique

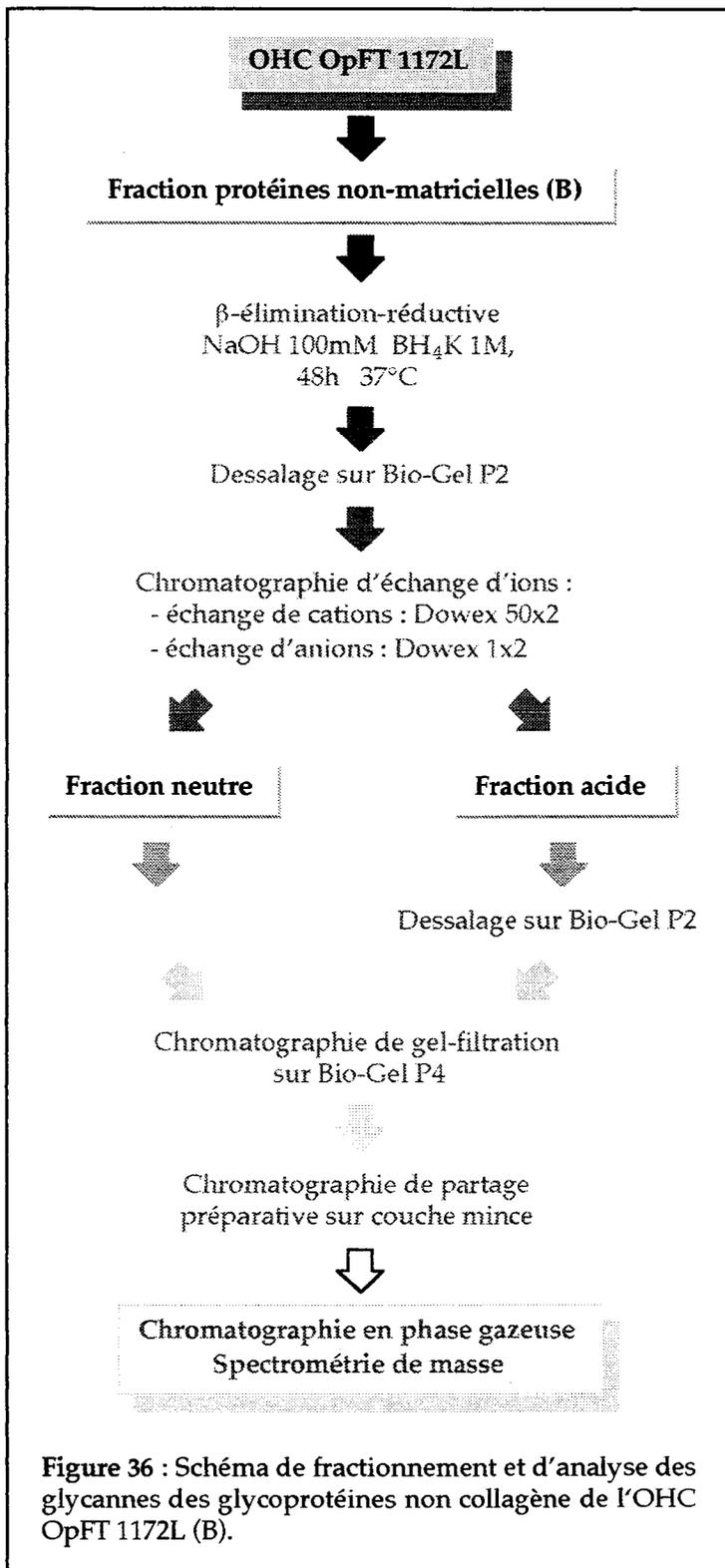


Figure 36 : Schéma de fractionnement et d'analyse des glycannes des glycoprotéines non collagène de l'OHC OpFT 1172L (B).

puis séché sous un flux d'air froid. L'analyse en mode reflectron est réalisée par le spectromètre Vision 2000 Finnigan Mat Instrument.

Résultats et discussion

Dans de ce chapitre, nous détaillerons l'ensemble des travaux entrepris sur la caractérisation biochimique de la préparation industrielle « Ossein Hydroxyapatite Complex » (OHC). Après l'exposé des méthodes de purification des protéines majeures, nous présenterons les résultats préliminaires obtenus sur l'étude de la glycosylation de la préparation OHC.

A. CARACTERISATION BIOCHIMIQUE DE LA PREPARATION INDUSTRIELLE OHC

A.I. ANALYSE PROTEIQUE

A.I.1. Dosage des protéines selon la méthode de Lowry modifiée

La méthode modifiée de dosage des protéines selon Lowry [302] est une méthode adaptée au dosage des protéines à caractère insoluble. L'OHC est un complexe phosphocalcique renfermant la matrice organique protéique de l'os. Sans traitement particulier, les seules protéines accessibles sont les protéines cellulaires et les protéines résiduelles de la circulation sanguine qui ne sont pas complexées avec la matrice minérale.

Après avoir déterminé les conditions optimales de dosage de l'OHC (robustesse de la méthode), l'étude a porté sur l'évaluation de la répétabilité et de la reproductibilité de cette méthode.

Afin de déterminer la robustesse de la méthode, l'étude est réalisée à des temps d'incubation variables (5, 10, 15 et 30 minutes) pour des températures de 50°C, 100°C et 125°C. Les concentrations arbitraires choisies pour cette étude s'échelonnent de 0 à 1mg/mL de NaOH 0,5M, SDS 0,2%. Les résultats sont décrits en **annexe p.174-176**.

Alors que les conditions optimales décrites par Lowry correspondent à une température d'incubation de 100°C pendant 10 minutes, il semble, dans le cas précis du dosage de l'OHC, que ces conditions ne soient pas les meilleures. En effet, la **figure 37** (p.112) décrit les mesures comparatives obtenues pour le dosage à 100°C 10 min et 125°C 5 min. Il s'avère que l'intensité d'absorbance à 125°C, dès 5 minutes d'incubation, est supérieure aux intensités d'absorbance observées pour 100°C à 5, 10, 15 ou même 30 minutes

(figure 38). Aucune amélioration n'est observée après 10 minutes d'incubation à 125°C (figure 39 p.113), si bien que 5 minutes suffisent au dosage. On admet donc que la méthode modifiée de dosage des protéines selon Lowry, adaptée à l'OHC, est optimale pour un temps d'incubation de 5 minutes, à une température de 125°C.

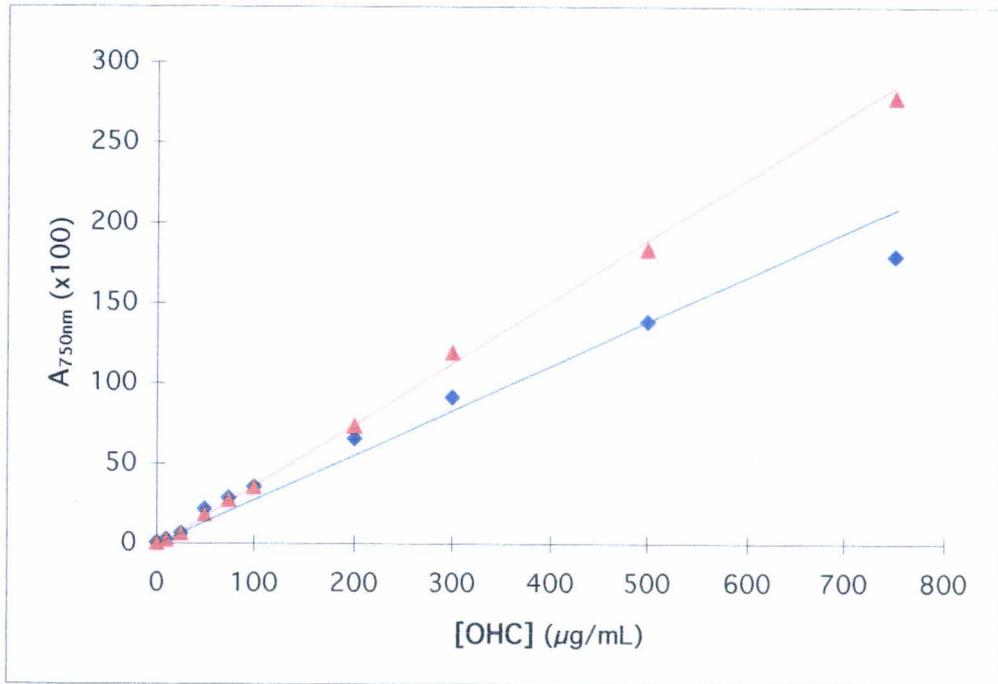


Figure 37 : Comparaison de la méthode de dosage à 125°C pendant 5 minutes (—) avec la référence établie par Lowry à 100°C pendant 10 minutes (—).

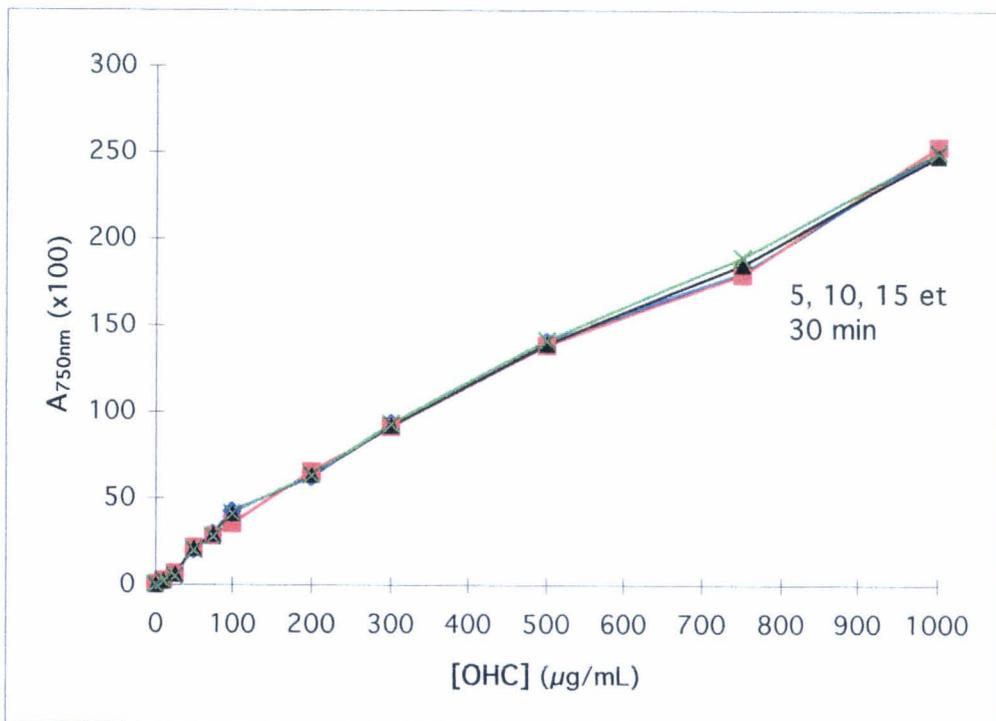


Figure 38 : Etude comparative des temps d'incubation de l'OHC à 100°C selon la méthode de dosage décrite par Lowry.

D'autre part, la limite inférieure de détection, dans les conditions précisées précédemment, correspond à une concentration de 50µg/mL de NaOH 0,5N, SDS 0,2%, alors que la limite supérieure est de 1mg/mL. En deçà et au delà de ces concentrations, la méthode n'est plus linéaire (**annexe p.177**). La limite de quantification pour 5 minutes d'incubation à 125°C est donc comprise entre 50 et 1000µg/mL.

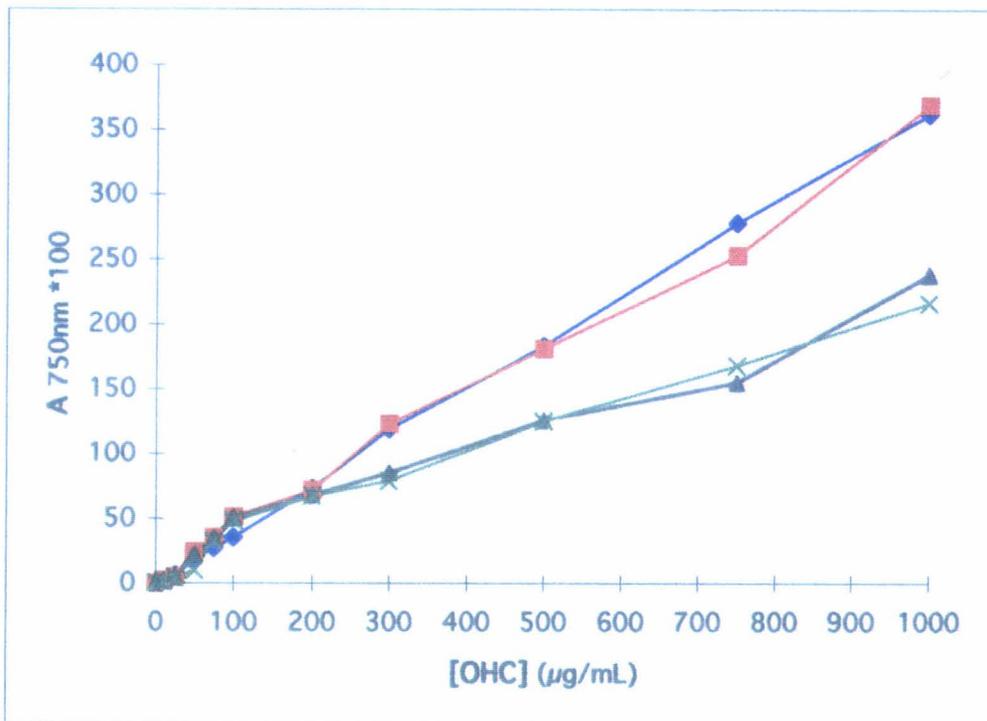


Figure 39 : Etude comparative des temps d'incubation de l'OHC à 125°C selon la méthode de dosage décrite par Lowry.

Ayant précisé les conditions optimales de la méthode de dosage, les études suivantes consistent en la détermination de la répétabilité du dosage dans ces conditions. Pour cela,

[OHC] (µg/mL)	A750 moyenne	Ecart-type A750	les dosages sont réalisés en dix exemplaires sur un même lot d'OHC et la moyenne et l'écart-type sont calculés
50	17,8	1,2	(tableau 9).
75	27,3	1,2	
100	35,3	1,8	
200	73,0	0,7	
300	118,5	5,3	
500	182,6	2,0	
750	277,9	5,2	
1000	361,6	8,8	

Tableau 9 : Absorbances moyennes et écart-types obtenus pour des concentrations variables en OHC

En se rapportant à la droite d'étalonnage obtenue par la mesure de l'absorbance à

750nm de différentes dilutions en sérum albumine bovine, on détermine graphiquement les concentrations en protéines de chacune des dilutions en OHC. Le **tableau 10** exprime ces valeurs de concentrations et les pourcentages en protéines de l'OHC correspondants.

Le calcul du pourcentage moyen en protéines de l'OHC est de $31,0\% \pm 1,1\%$, ce qui

équivalent à une imprécision de

3,5%. En réalisant le dosage dans des conditions différentes (date et

opérateur différents), on obtient

[OHC] ($\mu\text{g/mL}$)	A ₇₅₀ moyenne	[protéines] de l'OHC ($\mu\text{g/mL}$)	% en protéines de l'OHC
50	17,8	15,1	30,2
75	27,3	23,1	30,8
100	35,3	29,9	29,9
200	73,0	61,9	30,9
300	118,5	100,4	33,5
500	182,6	154,7	30,9
750	277,9	235,5	31,4
1000	361,6	306,4	30,6

Tableau 10 : Absorbances moyennes, concentrations en protéines et pourcentages de protéines des différentes concentrations en OHC

pourcentage de protéines dans l'OHC de $30,5\% \pm 1,4\%$.

En conclusion, la méthode modifiée de dosage décrite par Lowry se révèle être une méthode reproductible, adaptée au dosage des protéines insolubles, et plus particulièrement aux protéines de l'OHC. En outre, il s'avère que les conditions optimales nécessaires à ce dosage sont différentes de celles décrites par Lowry. Ainsi, après une étape initiale de solubilisation des protéines pendant 5 minutes à 125°C , l'expression du pourcentage des protéines de l'OHC est de $31,0\% \pm 1,1\%$. A titre indicatif, le pourcentage calculé des protéines de l'OHC à 100°C pendant 10 minutes est de $26,9\% \pm 5,3\%$.

A.I.2. Profils de migration électrophorétique sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE) des protéines de l'OHC - Analyse comparative des profils de différents lots OHC

La **figure 43** (p.123) correspond aux profils électrophorétiques (sur gel de polyacrylamide à gradient de concentration 4-20% en présence de SDS) du lot OHC OpFT 1172L. En conditions non réductrices, on observe la présence de différentes familles de protéines :

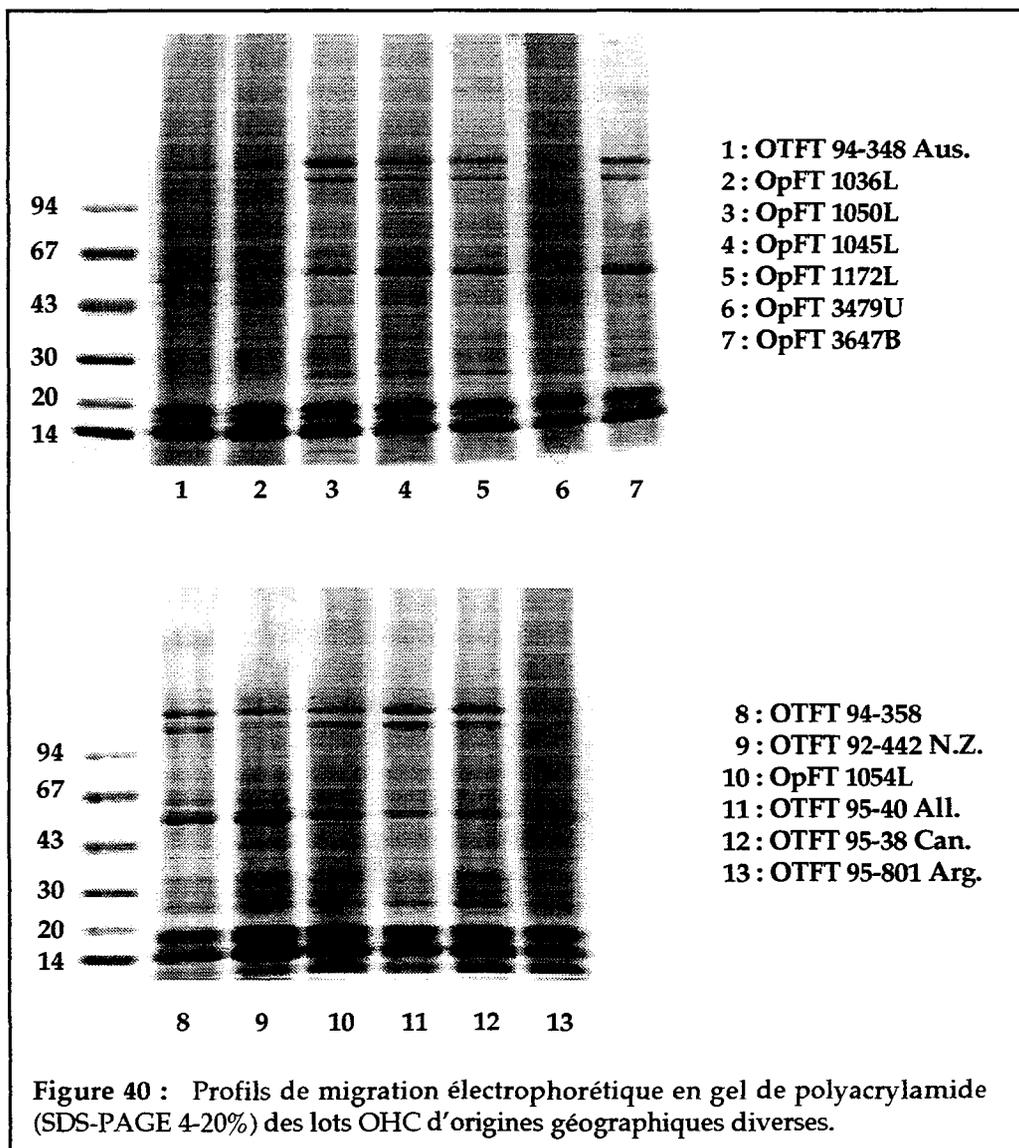
- les protéines de hautes masses moléculaires, supérieures à 200kDa, correspondant vraisemblablement aux protéoglycannes ;
- les protéines de type collagène de masses moléculaires voisines de 120-150kDa ;
- les phospho/sialoprotéines de masses moléculaires apparentes comprises entre 65 et 80kDa, telles que la sialoprotéine osseuse (BSP), l'ostéopontine et la BAG-75 ;
- les protéines de 55kDa de type α_2 HS glycoprotéine, sérum albumine bovine et/ou fétuine bovine ;
- les protéines de faibles masses moléculaires comprises entre 10 et 40kDa, comme l'ostéocalcine et l'ostéonectine.

Des différences dans la résolution électrophorétique de certaines de ces familles protéiques sont observées et, vraisemblablement, imputables à la plus ou moins grande richesse en sels des préparations d'OHC.

Par ailleurs, les différentes fractions (A), (B) et (G) correspondent respectivement aux fractions protéines matricielles de type collagène, protéines non collagéniques et protéines cellulaires obtenues au cours des différentes étapes de déminéralisation de la préparation industrielle brute (description p.96). En outre, le profil électrophorétique en présence de l'agent réducteur (2- β -mercaptoéthanol) présente des variations de migration, notamment en ce qui concerne la bande majeure à 55kDa, au profit d'une nouvelle bande à 67kDa. Ces résultats suggèrent la présence d'un ou plusieurs ponts de cystines internes à ces protéines, et nous verrons ultérieurement que ces protéines correspondent à la sérum albumine bovine, l' α_2 HS glycoprotéine et/ou la fétuine bovine.

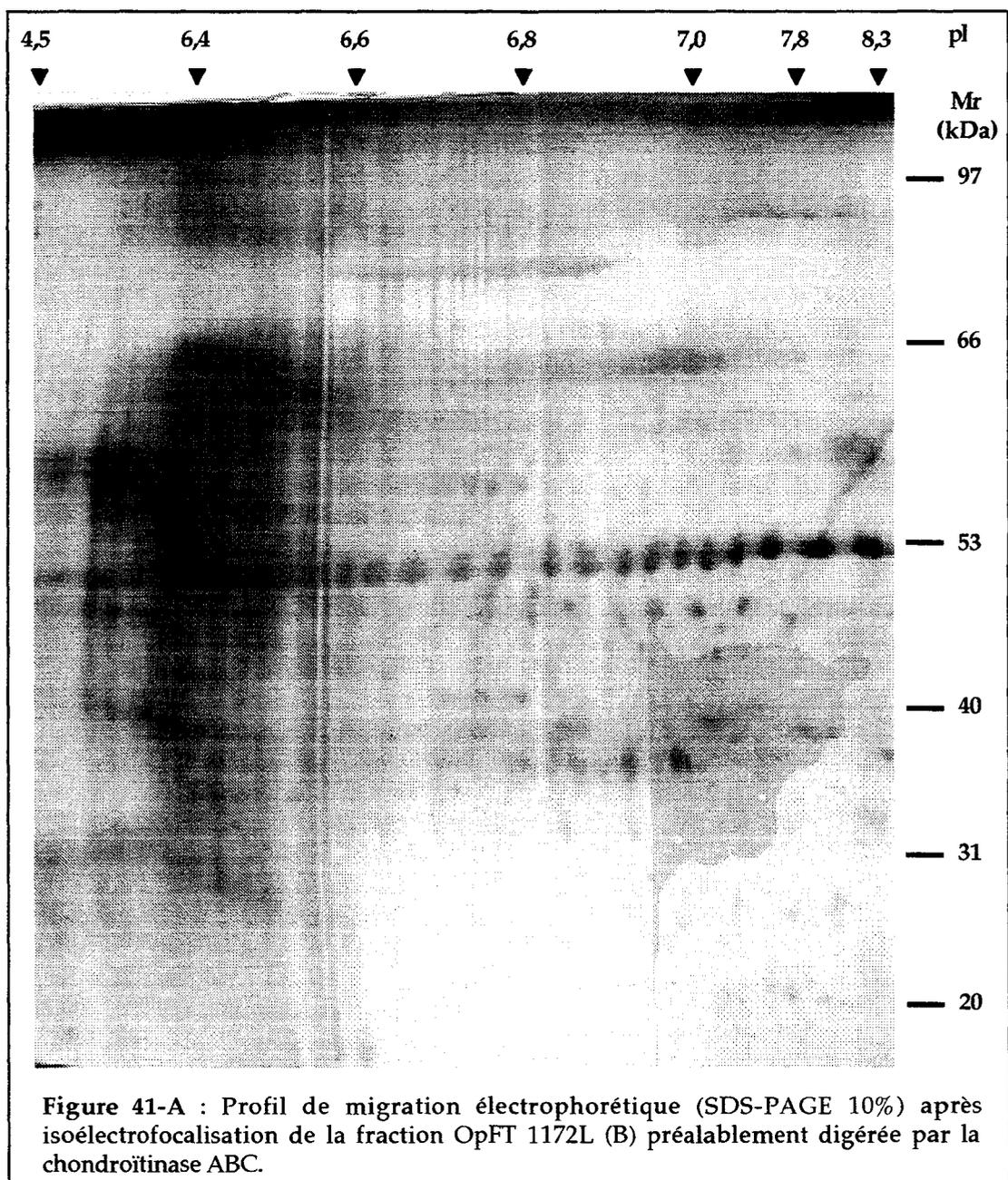
L'analyse électrophorétique des protéines de l'OHC avait pour but initial de mettre en évidence les familles protéiques majeures présentes dans la préparation industrielle. Ce système simple d'analyse a permis le contrôle de la reproductibilité des préparations et la comparaison inter-lots.

La **figure 40** décrit les profils de migration électrophorétique de différents lots OHC d'origines géographiques diverses. Exceptés les lots OpFT 3479U et OTFT 95-801 d'Argentine pour lesquels la présence de sels interfère avec la révélation des protéines de masses moléculaires élevées, les profils sont identiques, notamment en ce qui concerne les protéines de faibles masses moléculaires (<20kDa), celles de masses moléculaires proches de 55kDa et les familles de masses moléculaires élevées à 120kDa et 200kDa. On observe donc une bonne reproductibilité de la répartition des différentes familles de protéines dans chacun des lots OHC.

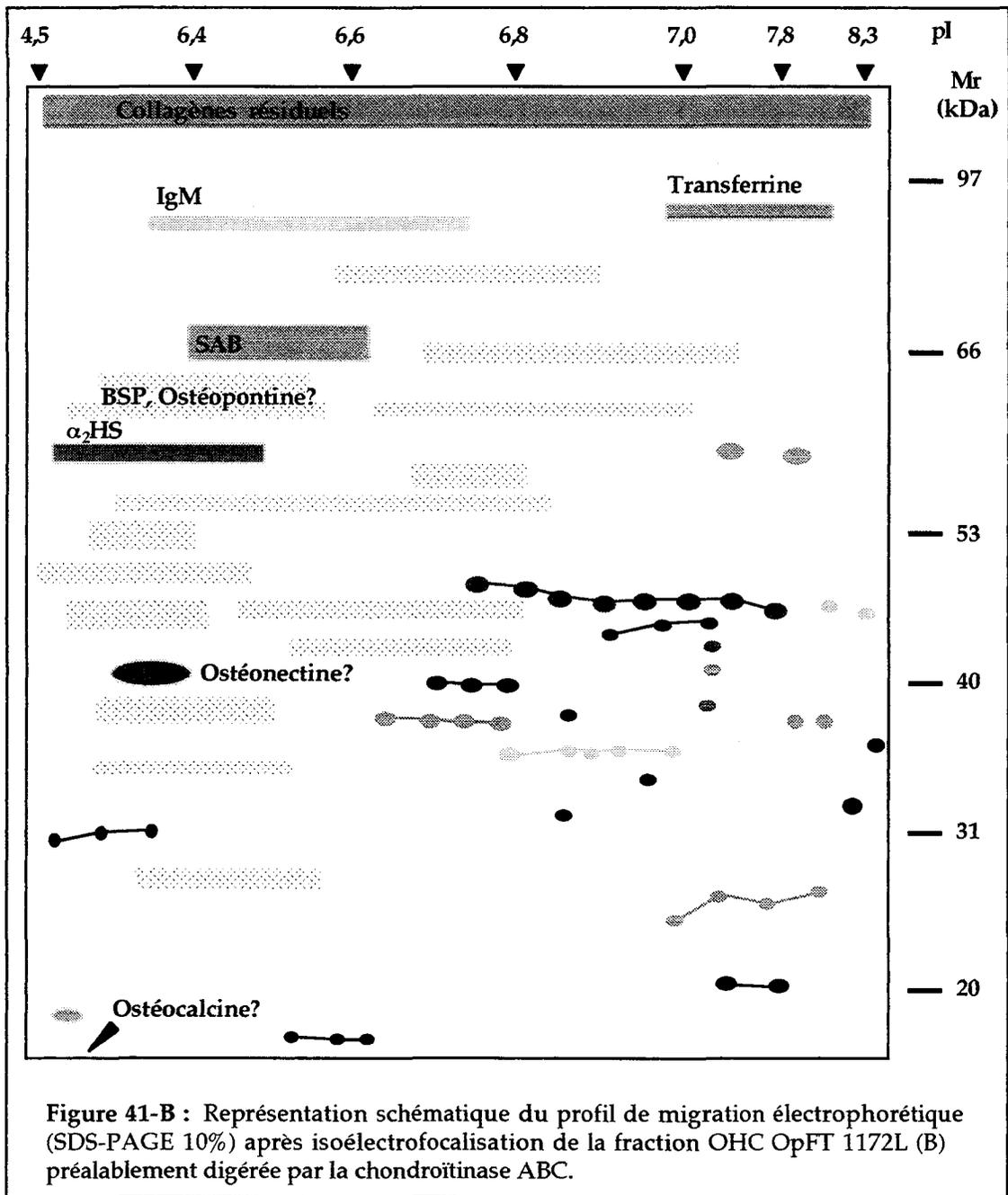


A.I.3 Electrophorèse bidimensionnelle de la fraction OHC (B) du lot OpFT 1172L

Etant donnée l'hétérogénéité des masses moléculaires des protéines osseuses non collagéniques, une électrophorèse bi-dimensionnelle est réalisée sur la fraction OHC (B) du lot OpFT 1172L, dans le but de cartographier les protéines majeures en fonction de leur point isoélectrique et de leur masse moléculaire apparente. Le caractère insoluble de la préparation industrielle brute OHC et la présence de sels ne permettent pas l'obtention d'un profil électrophorétique satisfaisant. L'électrophorèse est réalisée sur la fraction protéique (B) obtenue par déminéralisation et dessalée par chromatographie liquide haute performance en phase inverse sur colonne de C₈. En outre, une digestion des échantillons



par la chondroïtinase ABC permet l'obtention d'une fraction dépourvue en protéoglycannes.



La figure 41-A p.117 montre l'image électrophorétique obtenue, représentée schématiquement en 41-B. La séparation des protéines en fonction de leur point isoélectrique indique que la majorité d'entre elles ont un point isoélectrique compris entre 6.4 et 7.5. Ces protéines ont une masse moléculaire apparente comprise entre 20 et 100kDa.

En accord avec Delmas [314], on retrouve les protéines osseuses majeures telles que : la

sérum albumine bovine (pI 6.4-6.8 ; 67kDa), l' α_2 HS glycoprotéine et vraisemblablement les sialoprotéines osseuses (BSP et ostéopontine ; pI 4.6 à 6.0 ; respectivement 55 et 60-80kDa), et l'ostéonectine (pI 5.2-5.7 ; 39kDa). L'ostéocalcine n'est pas apparente sur cette réticulation de gel, mais doit se trouver au front de migration (pI 4.1 ; 14kDa). D'autre part des protéines de haut poids moléculaire n'ont pas migré dans le gel à 10%. Ces molécules correspondent vraisemblablement aux collagènes résiduels. Enfin, un grand nombre de protéines révélées n'ont pu être identifiées.

Ce profil de migration électrophorétique en deux dimensions, bien que ne permettant pas l'identification de l'ensemble des protéines non collagéniques de l'os, confirme l'hétérogénéité protéique de la fraction (B), tant d'un point de vue point isoélectrique que masse moléculaire.

A.I.4. Dosage des acides aminés par chromatographie liquide haute performance (CLHP)

Les résultats du dosage des acides aminés réalisé en triple exemplaire par CLHP du lot OHC OpFT 1172L sont exprimés en pourcentages dans le tableau ci-dessous.

	Asp	Glu	OH-Pro	Ser	Gly	His	Arg	Thr	Ala	Pro
OpFT 1172L	1,6	5,3	7,7	3,2	24,5	1,1	6,4	2,3	11,5	11,3
	Tyr	Val	OH-Lys	Cys	Ile	Leu	Phe	Lys	Met	
OpFT 1172L	0,8	3,8	n.d.	0,2	1,8	5,4	5,1	6,8	1,3	

L'acide aminé majoritairement dosé est le glycolle qui représente près de 30% des acides aminés de l'OHC. Il est caractéristique des protéines de hautes masses moléculaires de type collagène (dans le collagène osseux humain, le glycolle représente 31,9% des acides aminés dosés). L'hydroxyproline (autre résidu caractéristique du collagène), l'alanine et la proline sont les autres acides aminés majeurs de l'OHC. Sachant que la matrice organique des os longs est constituée à 90% par du collagène de type I, ces résultats confirment l'abondance de collagène dans la préparation industrielle OHC.

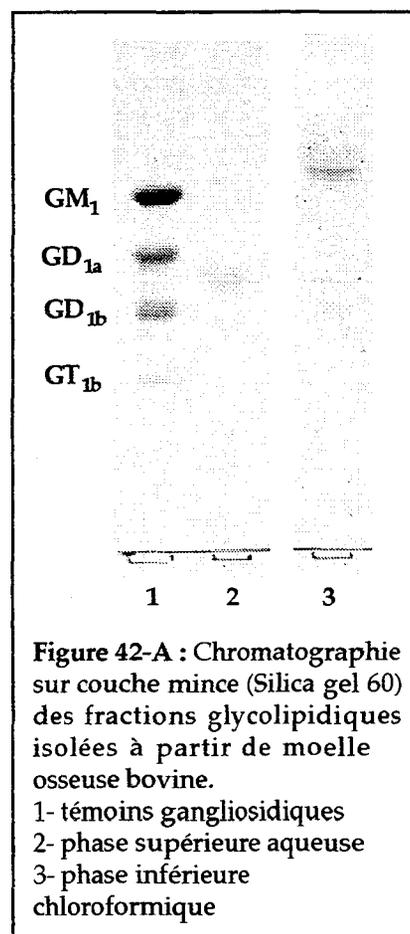
A.II. ANALYSE LIPIDIQUE

Les dérivés lipidiques sont extraits par le procédé de la méthode de Folch, modifié par Zanetta [306], basé sur le partage sélectif des lipides et glycolipides entre phase chloroformique (inférieure) et phase aqueuse (supérieure). Dans ce procédé, les lipides neutres et insaponifiables, ainsi que certains glycolipides neutres, sont retrouvés dans la phase chloroformique inférieure, alors que les glycolipides acides (gangliosides) sont retrouvés dans la phase aqueuse supérieure.

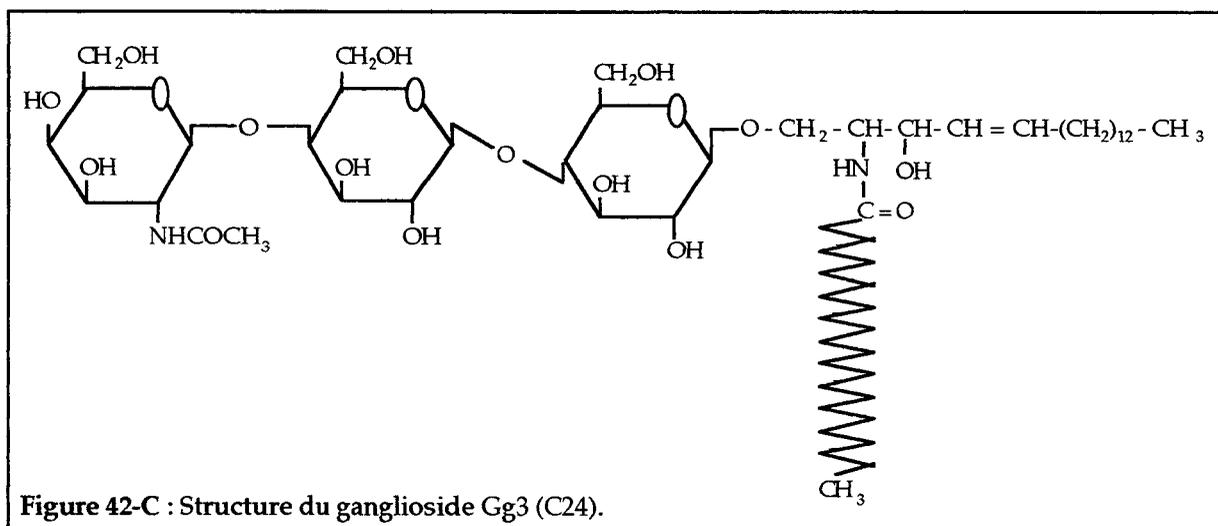
Une première série d'expériences est menée sur la préparation OHC. L'analyse chromatographique des deux fractions, après révélation à l'orcinoïl (révélateur spécifique des glucides), fait apparaître dans la fraction aqueuse une bande de migration intermédiaire aux témoins GD1a et GD1b (**figure 42-A**). Après chromatographie sur gel de silice, ce composé a pu être isolé et identifié comme du glucose libre entraîné lors de l'extraction.

La phase chloroformique fait apparaître un composé majeur de migration chromatographique supérieure au GM1, typique des glycolipides neutres de type globoside. Après isolement par chromatographie préparative sur silice, le composé est soumis à une analyse structurale. La composition molaire en monosaccharides, établie après méthanolyse acide par chromatographie en phase gazeuse des méthyl-glycosides triméthylsilylés, révèle la présence de galactose, glucose et N-acétyl galactosamine. L'étude en spectrométrie de masse de type MALDI-TOF (**figure 42-B** p.122) fait apparaître un pic unique de masse 1199.

La composition molaire associée à l'étude de spectrométrie de masse permet d'identifier le composé comme étant le



Gg3 de structure GalNAc-β1,4-Gal-β1,4-Glc-β-Cer (figure 42-C). Il est à noter que ce glycolipide de la série ganglio a été, dans un second type d'expérience, spécifiquement localisé dans la moelle osseuse. Le composé est généralement considéré comme un intermédiaire de biosynthèse des gangliosides sialylés Gg4, GM1b, GD1α, GT1β et GQ1β.

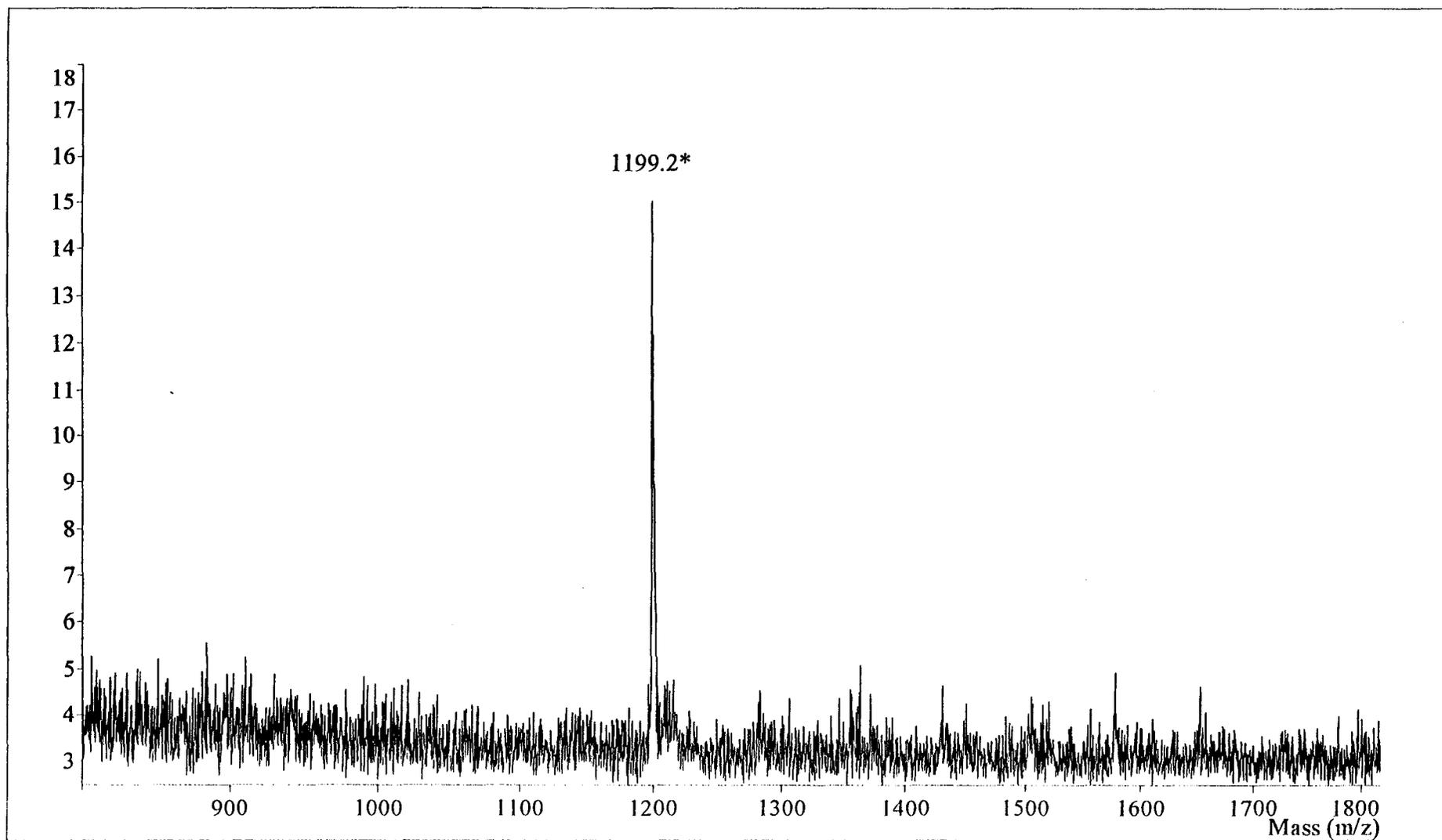


A notre connaissance, il s'agit de la première description de ce type de glycolipide dans la moelle osseuse. Les études réalisées par d'autres groupes avaient permis de caractériser d'autres glycolipides de la série ganglio tels le GM2 et le GD1a gangliosides dans la moelle osseuse [315]. Ces glycolipides, étant présents à l'état de traces sur les lignées cellulaires hématopoïétiques retrouvées dans l'os, n'ont pu être détectés dans notre étude.

A.III. ANALYSE GLUCIDIQUE

En ce qui concerne l'analyse glucidique de la poudre OHC, seuls les résultats sur le dosage des acides uroniques sont présentés dans ce chapitre. La glycosylation des protéines non collagène de la matrice organique de l'os fait l'objet d'une étude globale décrite p.145. Le lot OpFT 1172L renferme donc 3,65% d'acides uroniques. Ces résultats attestent de la présence dans l'OHC de protéoglycannes, puisque ces derniers sont exclusivement constitués de chaînes de glycosaminoglycannes correspondant à des polymères glucidiques riches en acides uroniques (50%).

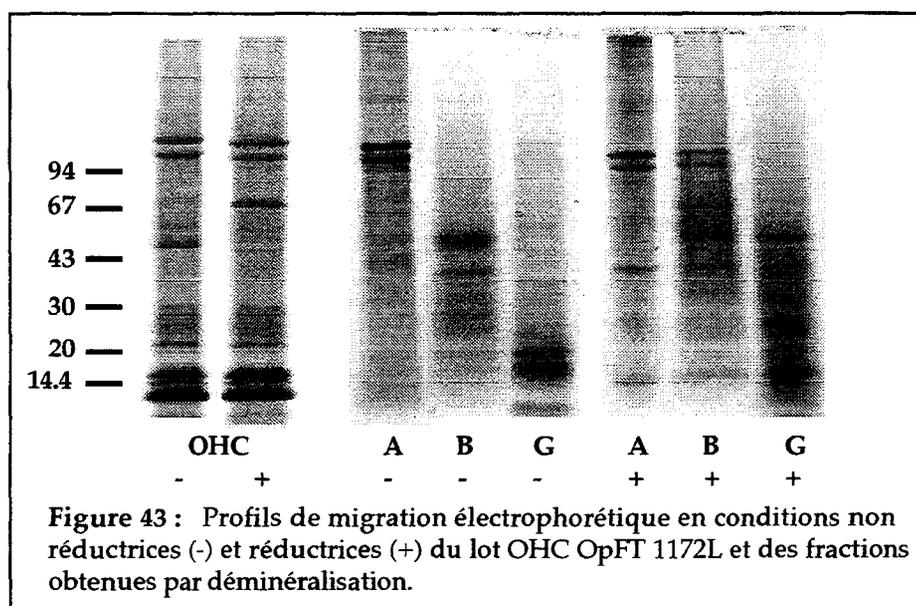
Figure 42-B : Etude en spectrométrie de masse de type MALDI-TOF du composé isolé de la phase chloroformique inférieure par chromatographie préparative sur silice.



B. MISE AU POINT D'UN PROCÉDÉ D'EXTRACTION DES PROTÉINES DE L'OHC

L'extraction des protéines de l'os nécessite l'emploi d'agents chimiques permettant la dissociation du réseau phosphocalcique de la matrice minérale. Une première étape, sans addition d'EDTA, permet néanmoins l'extraction des protéines accessibles, c'est à dire correspondant aux protéines cellulaires et/ou aux protéines de la circulation sanguine.

La **figure 43** montre le profil électrophorétique du lot OHC OpFT 1172L et des fractions (A), (B) et (G) sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE) à gradient de concentration 4-20%.



On observe dans la fraction (A) un net enrichissement en protéines de hautes masses moléculaires (>100kDa). Ces protéines insolubles dans le tampon d'extraction correspondent aux protéines matricielles de type collagène et aux protéoglycannes. La fraction (G) renferme des protéines de faibles masses moléculaires parmi lesquelles on retrouve majoritairement une protéine de 55kDa susceptible de correspondre à la sérum albumine et, probablement, l'ostéocalcine d'origine plasmatique et cellulaire.

La fraction (B) correspond, par opposition à la fraction (A), aux protéines non matricielles et renferme donc la totalité des familles de protéines non collagéniques de l'os. En effet, on observe un appauvrissement en protéines de masses moléculaires élevées et ce résultat concorde avec le fait qu'il y a bien eu extraction et séparation des protéines matricielles et non matricielles à partir de la préparation OHC.

En outre, un dosage des résidus d'acides aminés par chromatographie liquide haute performance est réalisé sur chacune des fractions (A), (B) et (G) du lot OHC OpFT 1172L. Les résultats exprimés en pourcentage sont décrits dans le tableau ci-dessous.

	Asp	Glu	OH-Pro	Ser	Gly	His	Arg	Thr	Ala	Pro
OHC	1,6	5,3	7,7	3,2	24,5	1,1	6,4	2,3	11,5	11,3
(A)	4.6	7.8	10.2	3.5	29.5	0.5	4.9	2.1	12.2	10.9
(B)	4.0	13.0	3.0	6.6	16.0	2.1	4.0	5.0	11.2	7.9
(G)	7.4	9.4	6.5	5.5	21.6	0.8	4.1	3.2	10.5	10.0
	Tyr	Val	OH-Lys	Cys	Ile	Leu	Phe	Lys	Met	
OHC	0,8	3,8	n.d.	0,2	1,8	5,4	5,1	6,8	1,3	
(A)	0.4	2.5	0.4	0.1	1.6	3.2	1.8	2.9	0.9	
(B)	1.2	5.0	n.d	0.4	2.4	7.5	3.3	7.0	0.4	
(G)	0.6	3.5	0.0	0.1	1.3	5.8	3.5	5.0	1.2	

Ainsi, on observe des différences qualitatives notables entre les protéines matricielles de type collagène (A), les protéines non collagène (B) et les protéines cellulaires (G). Dans la fraction (A), on observe un enrichissement non négligeable en résidus de glycocolle et d'hydroxyproline caractéristiques des collagènes. La fraction protéique (B), quant à elle, se caractérise par une bonne balance de la répartition des acides aminés, dont les majeurs sont le glycocolle, l'acide glutamique et l'alanine.

Parallèlement, les dosages des acides uroniques sur les différentes fractions (A) (3,75%), (B) (3,15%) et (G) (2,85%) décrivent un enrichissement en acides uroniques dans la fraction protéines matricielles (A), mais suggèrent également la présence résiduelle de protéoglycannes dans la fraction (B).

Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus précédemment et confirment le fractionnement des protéines matricielles (collagènes, protéoglycannes) et non matricielles lors de la déminéralisation de l'OHC.

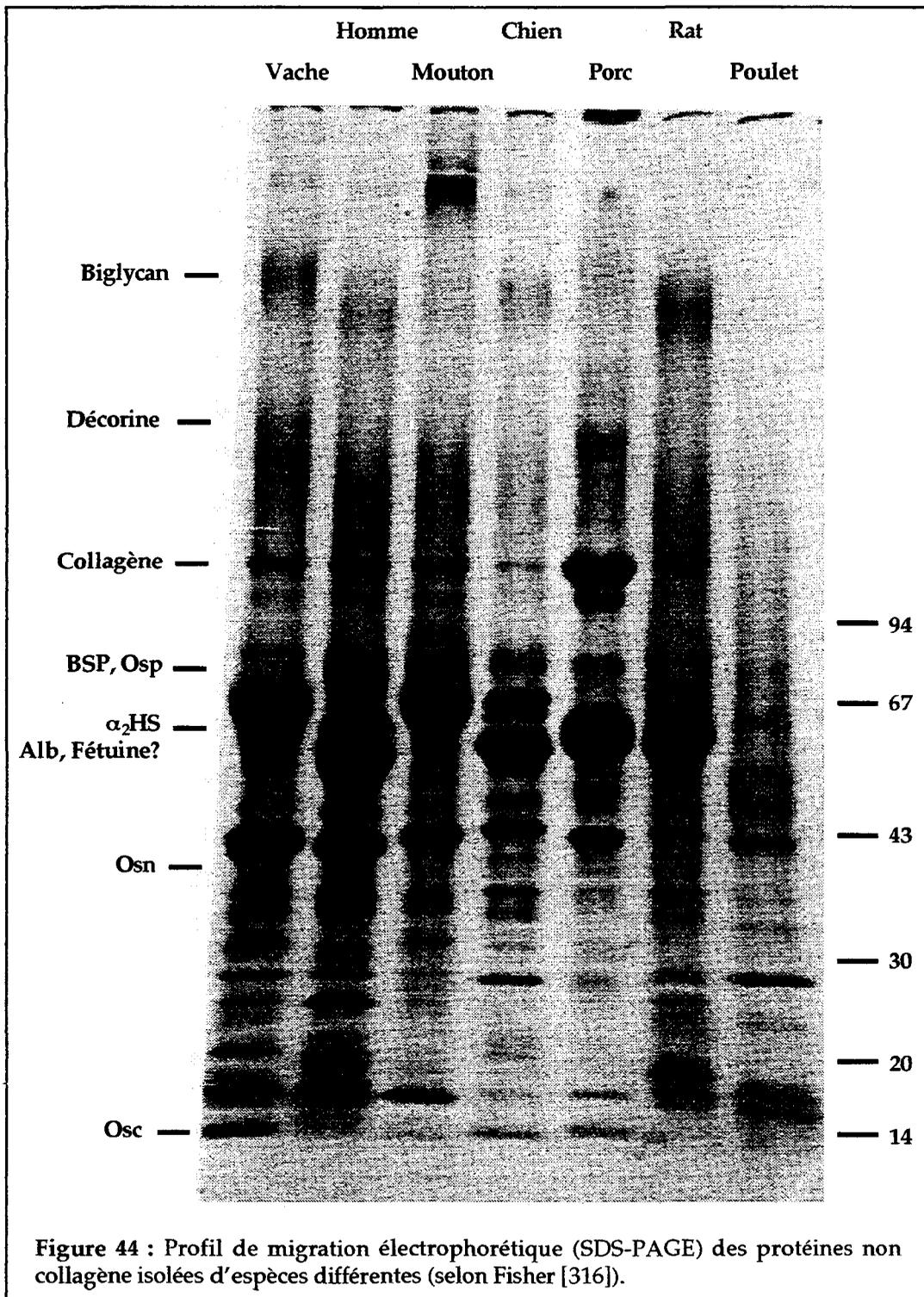


Figure 44 : Profil de migration électrophorétique (SDS-PAGE) des protéines non collagène isolées d'espèces différentes (selon Fisher [316]).

Le profil de migration électrophorétique des protéines non collagéniques isolées d'espèces différentes (figure 44) permet la description des différentes familles de protéines de la matrice organique du tissu osseux, à savoir :

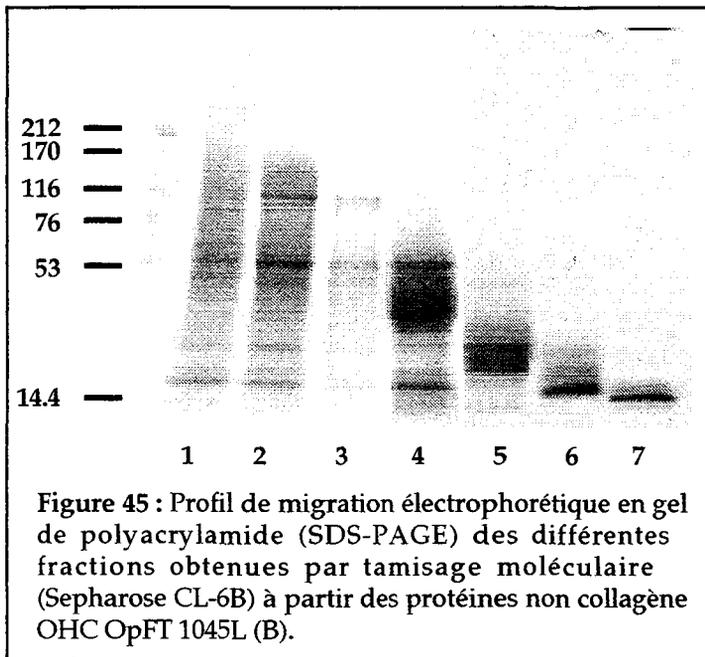
- les protéines de faibles masses moléculaires renfermant des résidus d'acide γ -carboxyglutamiques : l'ostéocalcine (Osc) et la Gla protéine matricielle (MGP), de masses moléculaires apparentes en gel de polyacrylamide respectives de 14 et 15kDa ;

- les phospho/sialoprotéines parmi lesquelles on retrouve l'ostéonectine (Osn), la sialoprotéine osseuse (BSP) et l'ostéopontine (Osp). L'ostéonectine migre à 39kDa en gel de polyacrylamide alors que la BSP et l'ostéopontine sont observées pour des masses comprises entre 60 et 80kDa. Ces deux dernières sialoprotéines ne sont pas révélées au bleu de Coomassie et nécessitent donc l'emploi de bleu Alcian ou d'un révélateur au nitrate d'argent modifié selon Merrill [304];

- les protéines d'origine plasmatique telles que l'albumine et l' α_2 HS-glycoprotéine (ou encore la fétuine pour les protéines d'origine bovine) à 55kDa en conditions non réductrices.

A ces familles de protéines non collagéniques s'ajoutent les protéines matricielles résiduelles telles que le collagène et les protéoglycannes de type décorine (PG-II) et biglycan (PG-I). Ces deux petits protéoglycannes, de masses moléculaires 80 et 120kDa environ, présentent un profil de migration à 135 et 270kDa lorsqu'ils sont révélés au bleu Alcian. Bien que l'on ne s'attend pas à la révélation de ces protéines matricielles, leur présence résiduelle dans la fraction (B) met en avant leur forte interaction avec de nombreuses protéines et glycoprotéines de la matrice organique osseuse. Les collagènes et protéoglycannes sont effectivement les molécules essentielles à l'agencement de la matrice organique. Ils interviennent dans chacune des étapes du remodelage osseux et correspondent au site potentiel d'initiation de la minéralisation de cette matrice organique.

C. CARACTERISATION ET ISOLEMENT D'UNE PROTEINE MAJEURE : L'ALPHA 2 HS-GLYCOPROTEINE



Le profil électrophorétique de la fraction (B) met en évidence une grande hétérogénéité protéique puisque les masses moléculaires s'échelonnent, en condition non réductrice, de 10kDa à 350kDa environ. Le schéma de fractionnement de l' α_2 HS glycoprotéine est décrit **figure 34** (p.97).

Une première étape de tamisage moléculaire sur colonne de Sepharose des protéines non matricielles a effectivement permis une séparation de ces protéines en fonction de leur masse moléculaire. Toutefois, les protéines de hautes masses moléculaires (collagènes et protéoglycannes résiduels) subsistent dans de nombreuses fractions. Malgré l'utilisation de tampons dissociants (semblables à ceux utilisés lors du fractionnement des protéines matricielles et non matricielles), leur présence dans ces fractions met en avant leur forte interaction avec les autres protéines. A ce stade de purification, cette méthode ne permet pas l'isolement des protéines d'intérêt à 55kDa, mais seulement un nouvel enrichissement de ces protéines. En ce qui concerne les protéines de faible masse moléculaire (comprises entre 10 et 35kDa), on observe l'obtention de différentes fractions susceptibles de contenir les Gla-protéines telles que l'ostéocalcine et la Gla-protéine matricielle (**figures 45 et 46** p.128).

Les étapes suivantes de la purification de l' α_2 HS glycoprotéine sont basées sur la méthode décrite par Arnaud [317, 318].

L' α_2 HS glycoprotéine présente des affinités variables avec le Procion red HE-3B et le Cibacron blue F3-GA immobilisés sur gel d'agarose (Pharmacia).

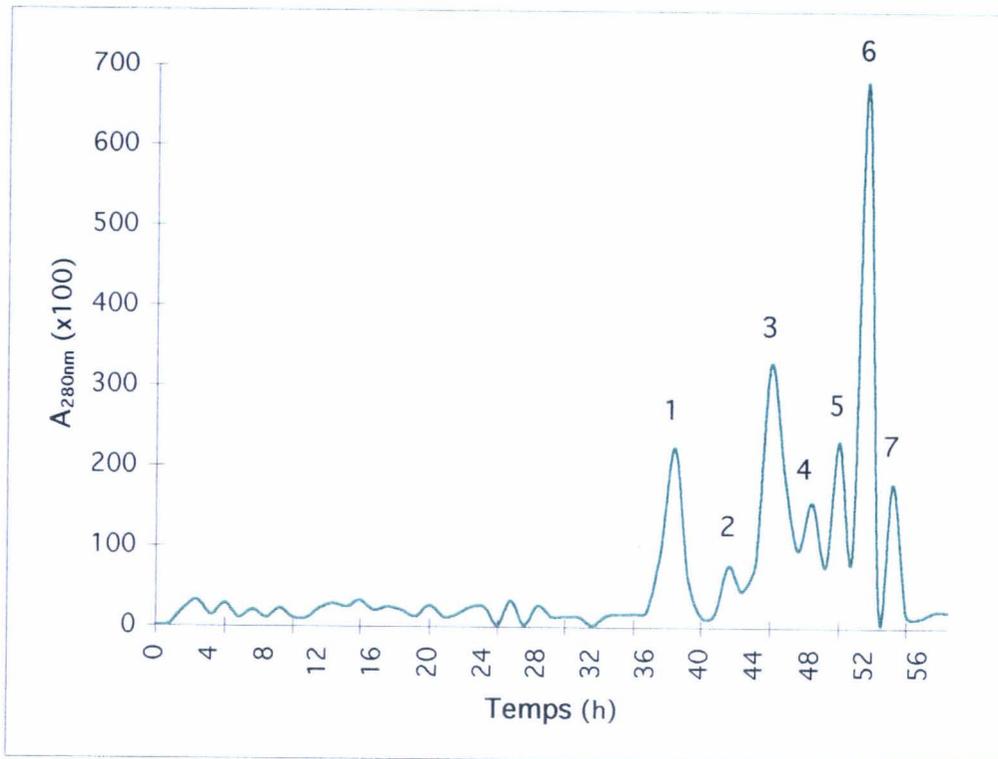


Figure 46 : Tamisage moléculaire (Sephacrose CL-6B) de la fraction protéique non collagène OHC OpFT 1045L (B).

A pH5.8, l' α_2 HS glycoprotéine est retenue sur colonne de Procion red. Un gradient continu en NaCl est nécessaire à l'éluion d'une fraction enrichie en protéines dont le profil de migration électrophorétique est proche de 55kDa (figures 47 et 48 p.129).

Globalement on retrouve deux types de fractions :

- la fraction non retenue (1) dépourvue en protéines de 55kDa ;

- les fractions retenues (2 et 3 ; NaCl 400/600mM) parmi lesquelles se trouvent les protéines de 55kDa, mais également un grand nombre de protéines de faibles masses moléculaires.

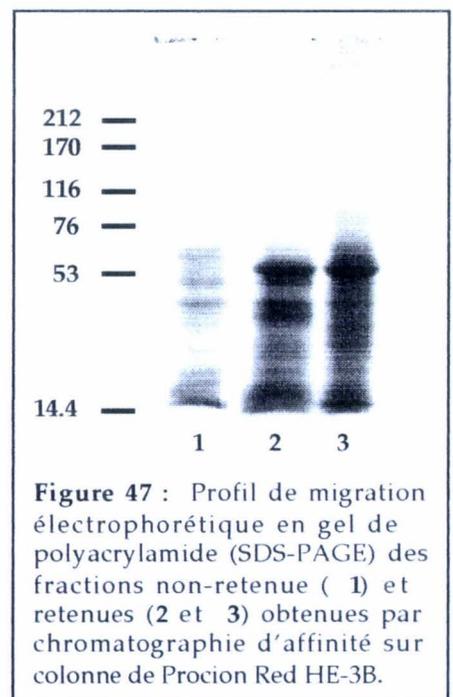


Figure 47 : Profil de migration électrophorétique en gel de polyacrylamide (SDS-PAGE) des fractions non-retenue (1) et retenues (2 et 3) obtenues par chromatographie d'affinité sur colonne de Procion Red HE-3B.

Etant donnée l'origine osseuse des protéines à isoler et la présence établie de sérum albumine bovine dans ce tissu, nous nous sommes posés la question de savoir si la sérum

albumine bovine est présente dans la fraction retenue sur colonne de Procion red HE-3B.

De plus, suite à l'analyse comparative des séquences primaires des protéines, Christie [319]

considère que la fétuine bovine serait l'homologue de l' α_2 HS-glycoprotéine humaine.

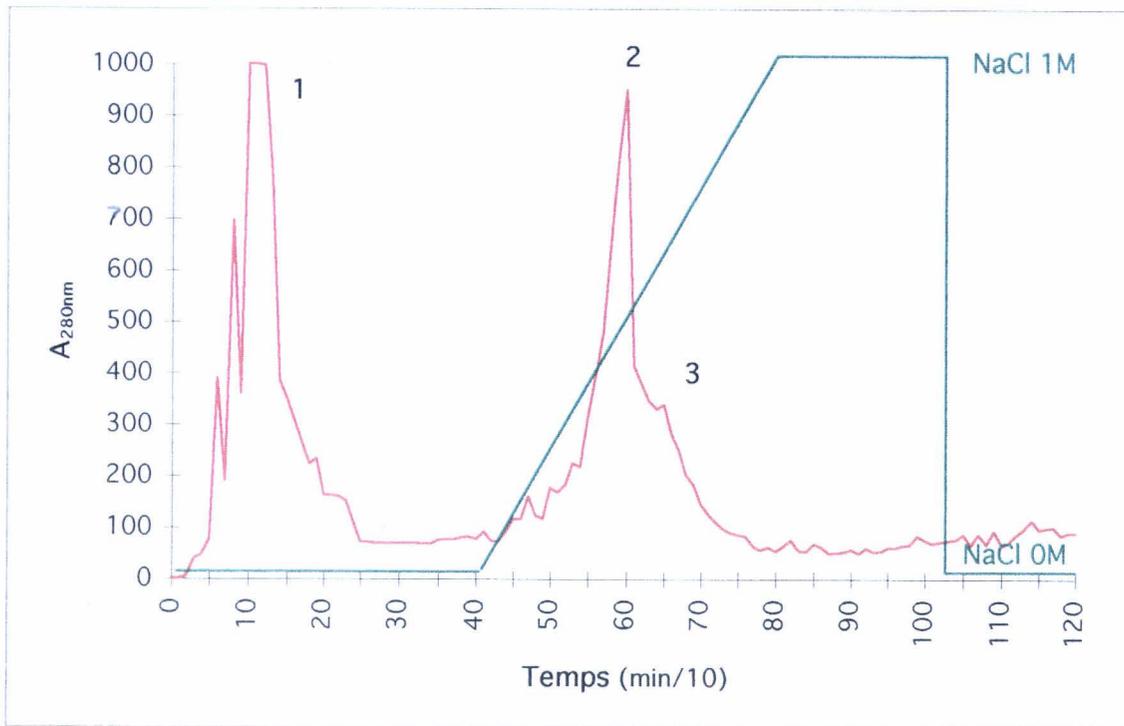


Figure 48 : Chromatographie d'affinité (Procion Red HE-3B) des fractions d'intérêt isolées par tamisage moléculaire des protéines OHC OpFT 1045L (B).

Toutefois, la fétuine est une protéine sérique strictement fœtale et son homologue, s'il est présent dans l'os, pourrait se différencier de la fétuine.

Les profils de migration électrophorétique de la sérum albumine bovine (SAB), de la fétuine bovine et de la bande majeure observée dans l'OHC sont strictement identiques, avec une masse moléculaire apparente de 55kDa en conditions non réductrices et de 67kDa en conditions réductrices. Afin d'affiner l'étude, il s'avérerait indispensable, dans un premier temps, d'obtenir une fraction retenue sur Procion red HE-3B dépourvue en

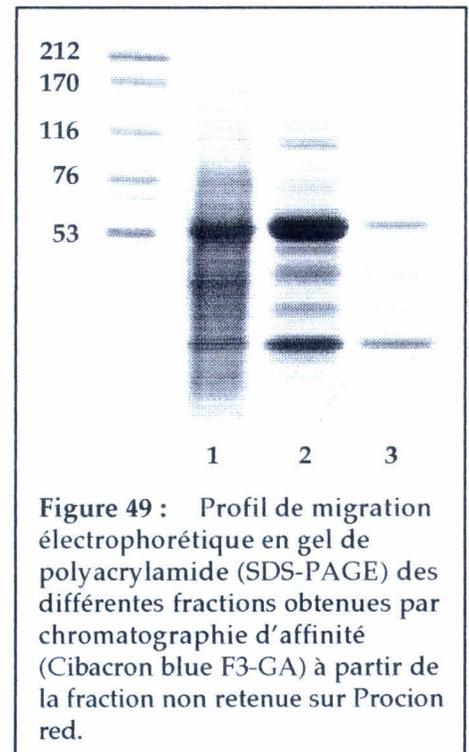


Figure 49 : Profil de migration électrophorétique en gel de polyacrylamide (SDS-PAGE) des différentes fractions obtenues par chromatographie d'affinité (Cibacron blue F3-GA) à partir de la fraction non retenue sur Procion red.

sérum albumine bovine. Pour cela, on procède à une nouvelle étape de purification sur colonne d'affinité spécifique de l'albumine (Cibacron blue F3-GA). Puis, dans un second temps, les immunorévélation par des anticorps spécifiques de la fétuine bovine, de la

sérum albumine bovine et de l' α_2 HS glycoprotéine humaine sont réalisées sur chacune des fractions obtenues par chromatographie d'affinité.

Le profil électrophorétique des différentes fractions obtenues par chromatographie d'affinité sur Cibacron blue à partir des protéines retenues sur Procion red (**figures 49 p.129 et 50**) correspond successivement à : 1) la fraction non retenue dont la bande majeure à 55kDa doit correspondre à l' α_2 HS-glycoprotéine ; 2) une première fraction retenue dont le profil électrophorétique laisse penser qu'elle contiendrait à la fois la sérum albumine bovine et la fétuine bovine ; 3) la fraction fortement retenue dont la migration électrophorétique de la bande majeure est légèrement supérieure à 55kDa. Ces variations de migration, bien que peu significatives, suggèrent que cette fraction fortement retenue sur Cibacron blue contiendrait de manière indépendante la fétuine bovine ou la SAB.

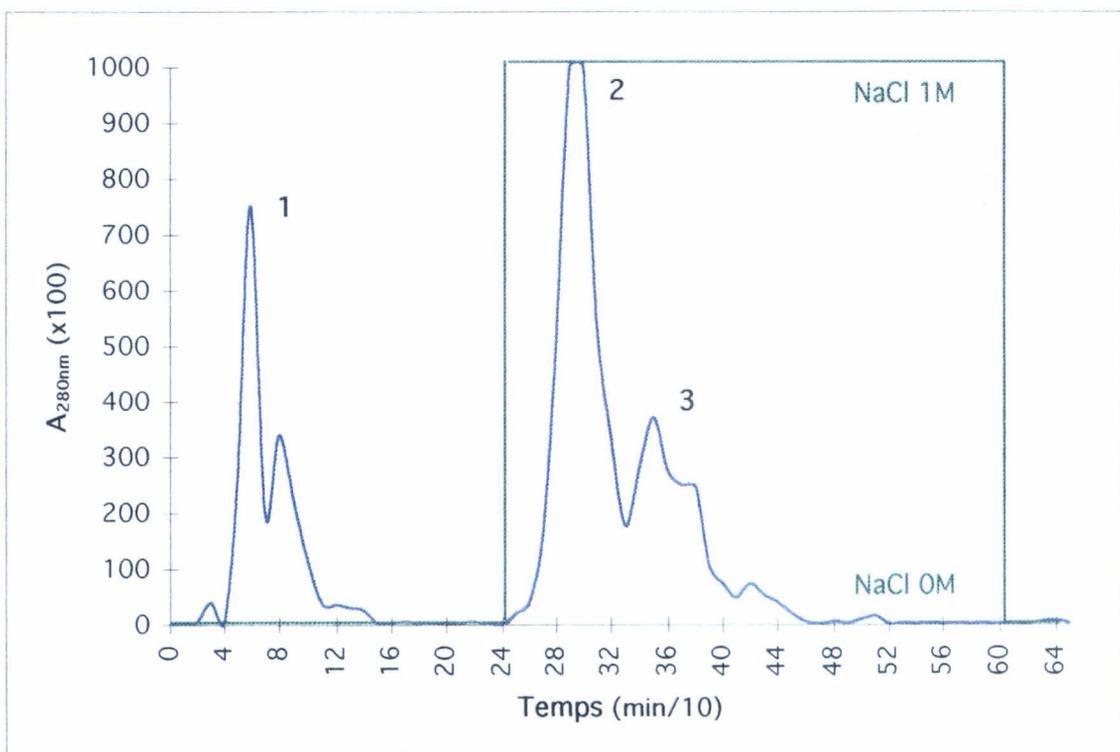
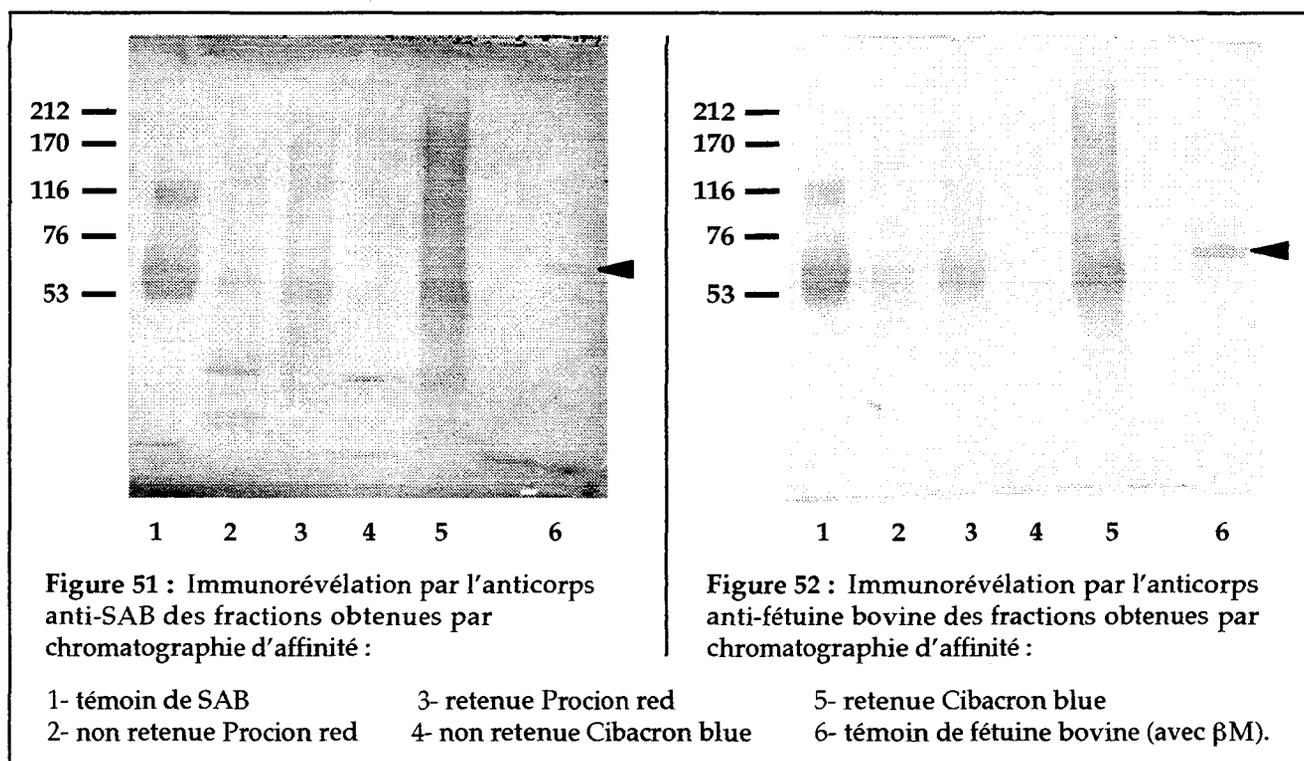


Figure 50 : Chromatographie d'affinité (Cibacron blue F3-GA) de la fraction retenue par chromatographie d'affinité sur colonne de Procion red.

Les études par immunorévélation s'avèrent donc essentielles pour la caractérisation et l'identification précise des protéines attendues dans chacune des fractions isolées par chromatographie d'affinité.

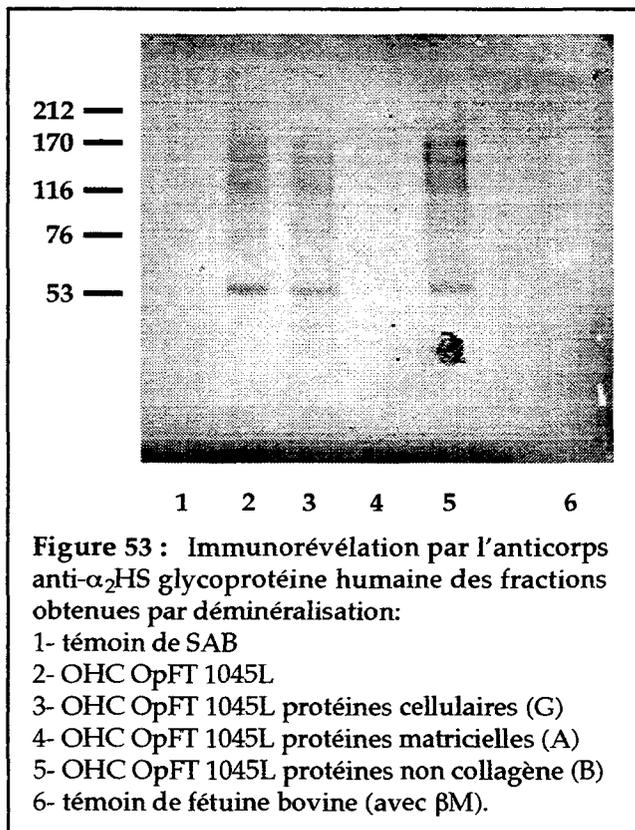
Les résultats obtenus par l'anticorps anti-SAB et l'anticorps anti-féтуine bovine sont présentés figures 51 et 52. On note la présence de SAB et de féтуine bovine dans chacune des fractions isolées par chromatographie d'affinité, exceptée la fraction non-retendue sur colonne de Cibacron blue. Ces résultats confirment le fait que la SAB est bien retenue sur colonne de Cibacron blue. Toutefois, les témoins de féтуine bovine et de SAB sont révélés à la fois par l'anticorps anti-SAB et l'anticorps anti-féтуine bovine. De plus, de nombreuses autres bandes apparaissent dans chacune de ces fractions. On attribue donc une faible spécificité de réaction à ces anticorps primaires (anti-SAB et anti-féтуine bovine) ou secondaires (anti-sérum de lapin et anti-sérum de souris). Mais, des tests en présence des anticorps secondaires ont montré des résultats satisfaisants quant à leur spécificité de réaction.



En conclusion, les anticorps polyclonaux primaires anti-SAB et anti-féтуine bovine utilisés ne sont pas hautement spécifiques. D'autre part, il apparaît que la SAB et, probablement la féтуine bovine, sont en fait deux protéines majeures de la matrice organique de l'OHC. Même si l'utilisation de tels anticorps polyclonaux ne permet pas de certifier l'absence de SAB et de féтуine bovine dans la fraction non retenue sur colonne de

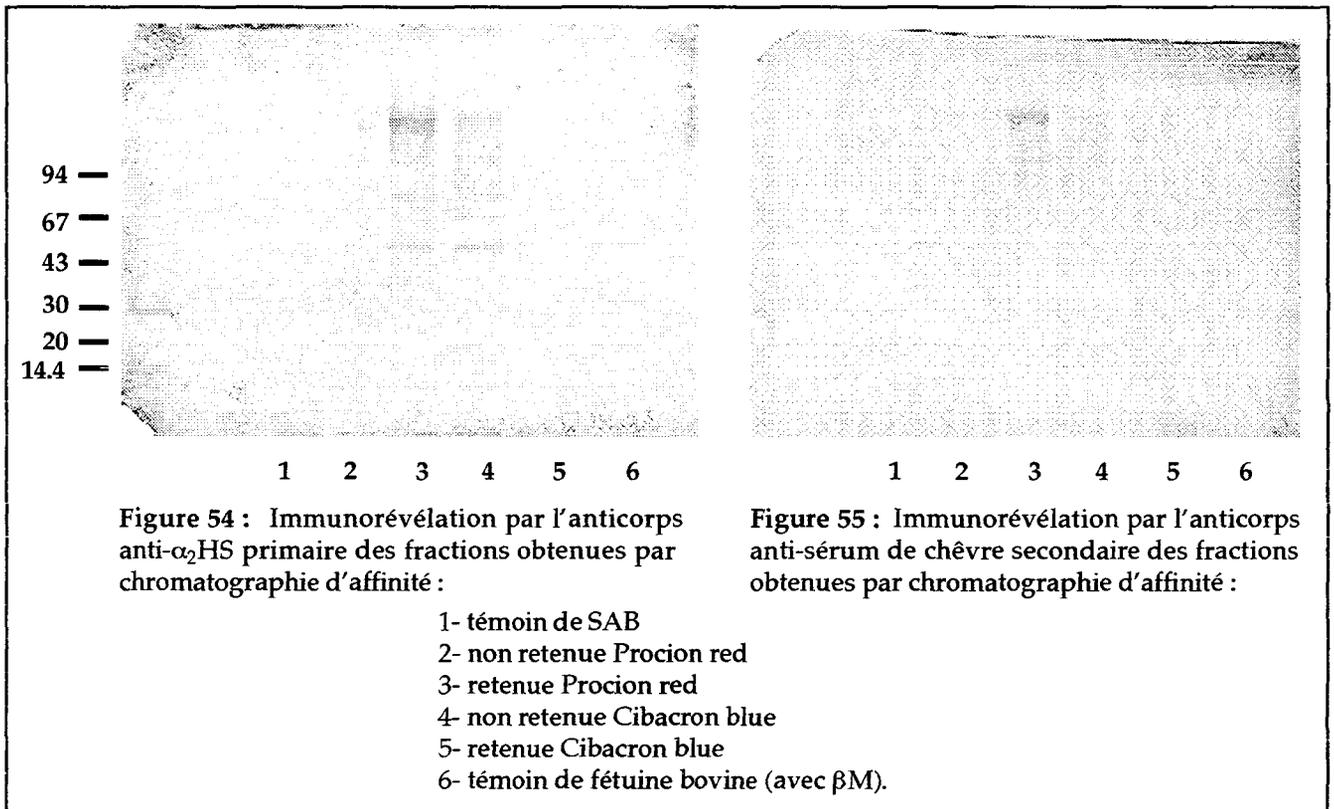
Cibacron blue, des tests d'affinité en présence de protéines commerciales ont effectivement démontré que ces deux protéines sont retenues sur Cibacron blue. On admet donc qu'il y a bien eu fractionnement de la SAB et de la fétuine bovine sur colonne de Cibacron blue F3-GA à partir de la fraction retenue sur colonne de Procion red HE-3B.

L'immunorévélation par l'anticorps anti- α_2 HS glycoprotéine humaine s'avère indispensable pour confirmer, d'une part, la présence de cette glycoprotéine dans l'OHC et, d'autre part, sa purification par chromatographie d'affinité. Les figures 53, 54 et 55 (p.133) représentent les immunorévélations par l'anticorps polyclonal anti- α_2 HS glycoprotéine humaine des fractions obtenues lors de la déminéralisation de l'OHC et des fractions purifiées par chromatographies d'affinité. Les témoins de fétuine bovine et de SAB ne sont pas révélés par cet anticorps. Mais, l'OHC, les protéines cellulaires (G) et les protéines non collagènes (B) présentent une bande majeure à 55kDa et des bandes d'intensité de révélation plus faible entre 150 et 200kDa. De plus, la fraction retenue sur Procion red et celle non retenue sur Cibacron blue sont les seules à être révélées par l'anticorps anti-



α_2 HS glycoprotéine humaine. Toutefois, on retrouve, en plus d'une bande à 55kDa, les protéines de masses moléculaires plus élevées similaires à celles observées dans les fractions OHC, (G) et (B). La révélation de ces fractions semble être aspécifique puisque le seul anticorps secondaire anti-sérum de chèvre révèle les mêmes bandes de masses moléculaires supérieures à 120kDa. On considère donc que les protéines de hautes masses moléculaires (vraisemblablement des collagènes ou des protéoglycannes résiduels)

sont exclusivement révélées par cet anticorps secondaire anti-sérum de chèvre, alors que la bande à 55kDa est révélée spécifiquement par l'anticorps primaire anti- α_2 HS glycoprotéine humaine.



En conclusion, ces résultats confirment le fractionnement de l' α_2 HS glycoprotéine humaine sur les colonnes d'affinité Procion red HE-3B et Cibacron blue F3-GA. Etant donnée l'absence de révélation des témoins de fétuine bovine et de SAB par l'anticorps anti- α_2 HS glycoprotéine humaine, il semble que l' α_2 HS glycoprotéine humaine ou un homologue de cette glycoprotéine (différent de la fétuine bovine ou de la SAB) s'accumule dans la matrice organique de l'os d'origine bovine. Le séquençage de cette protéine devrait ultérieurement confirmer sans ambiguïté son identification. Le but initial de cette étude étant d'isoler une protéine majeure susceptible de servir à la standardisation ultérieure de différents lots OHC, l' α_2 HS glycoprotéine humaine ne correspondait plus à nos espérances. En effet, en supposant la présence de cette glycoprotéine dans la matrice osseuse bovine, il s'avère qu'elle s'y accumule à des taux relativement faibles. La bande majeure observée dans la fraction (B) à 55kDa sur gel de

polyacrylamide en conditions non réductrices correspond essentiellement à la sérum albumine bovine et probablement à la fétuine bovine.

La suite de ces travaux a donc consisté en l'élaboration d'une technique de fractionnement et d'isolement de protéines majeures de la matrice organique de l'os telles que le sont les phospho/sialoprotéines acides.

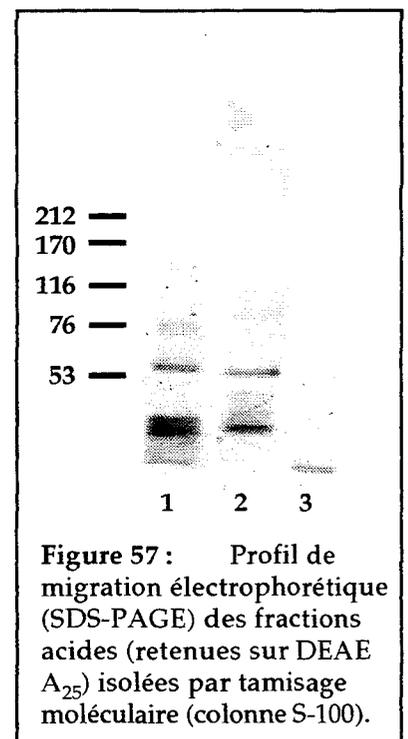
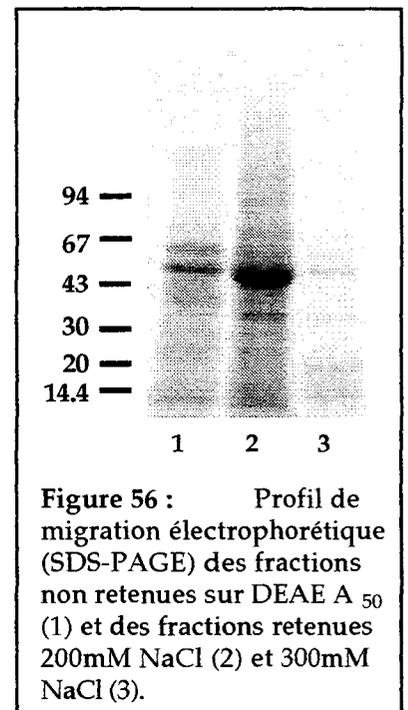
D. ISOLEMENT ET CARACTERISATION DES PROTEINES ACIDES : LES SIALO/PHOSPHOPROTEINES

Le schéma de fractionnement de ces protéines acides est décrit **figure 35** (p.100). La fraction protéique (B) du lot OHC OpFT 1172L est déposée sur une première colonne d'échange d'anions (DEAE-A₅₀). Si les fractions non retenues sur ce type de colonne se caractérisent par une grande hétérogénéité de protéines (masses moléculaires comprises entre 10 et 300kDa environ), la fraction faiblement retenue (200mM NaCl) est enrichie en protéines acides de masses moléculaires supérieures à 50kDa (**figure 56**). Parmi ces protéines, on note la révélation d'une bande majeure à 55kDa correspondant vraisemblablement à l'albumine, la fétuine bovine et/ou l' α_2 HS glycoprotéine ; les protéines de masses moléculaires supérieures à 150kDa étant probablement des protéoglycannes résiduels.

La fraction très acide (300mM NaCl), qui représente approximativement 10% des protéines de la fraction (B) selon Fisher [238], est chromatographiée sur une seconde colonne d'échange d'anions (DEAE-A₂₅). L'éluion par un gradient linéaire en NaCl permet l'obtention de deux nouvelles fractions acides.

Etant donné la grande hétérogénéité des masses moléculaires observée pour ces protéines acides, une étape chromatographique supplémentaire de tamisage moléculaire sur colonne de Sephacryl S-100 par FPLC est réalisée.

Trois fractions sont ainsi obtenues (**figures 57 et 58** p.136). Le pic 1 correspond majoritairement aux protéines exclues du gel et faiblement retenues, et le pic 2 se



caractérise par la présence de protéines majeures à 35, 40 et 60kDa. Enfin, le pic 3 correspond aux sels résiduels et contiendrait un ou plusieurs peptides de masses moléculaires inférieures à 6-8kDa.

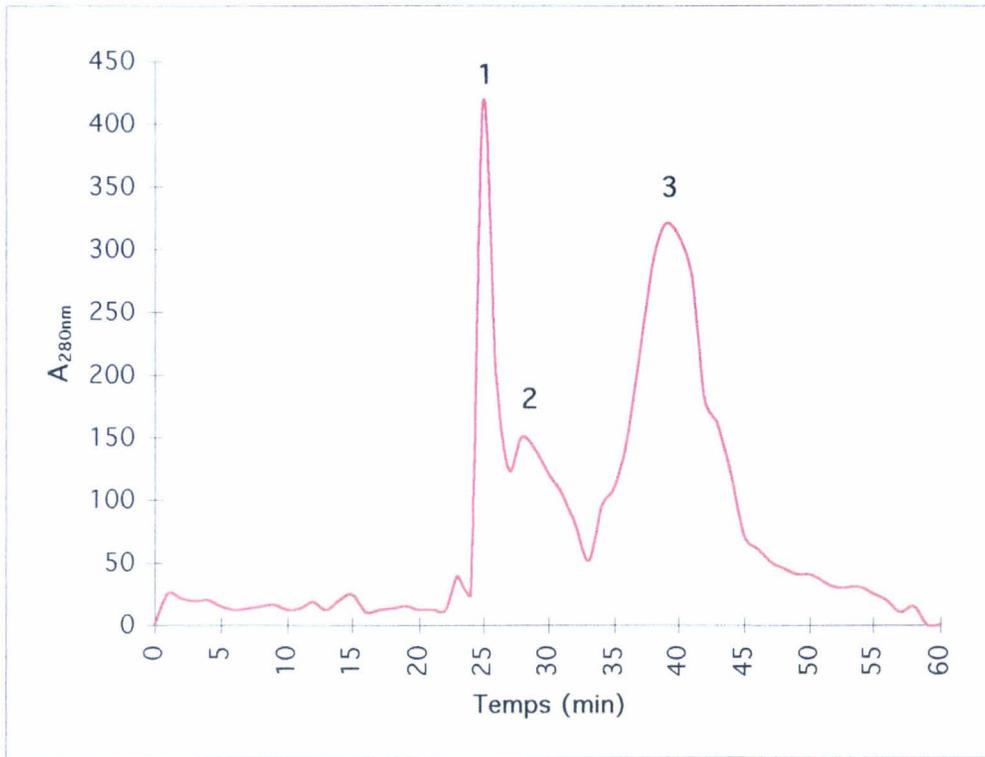


Figure 58 : Tamisage moléculaire (Sephacryl S-100) de la fraction protéique fortement retenue sur colonne d'échange d'anions (DEAE A25 0,3M NaCl).

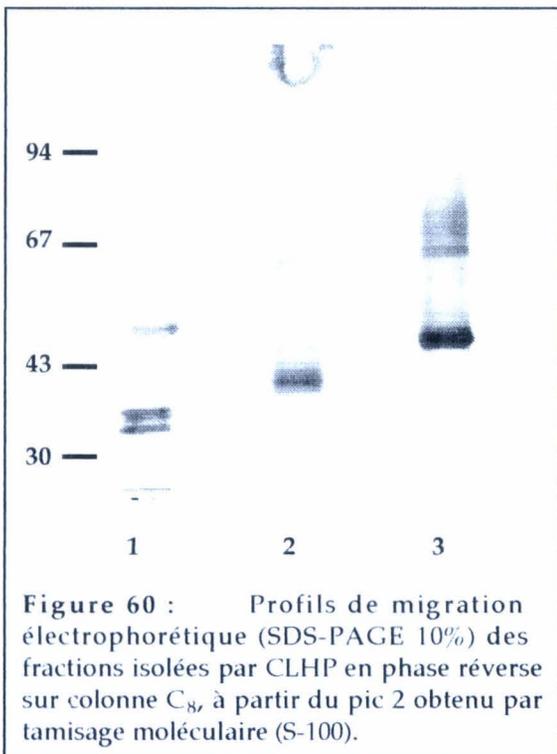


Figure 60 : Profils de migration électrophorétique (SDS-PAGE 10%) des fractions isolées par CLHP en phase réverse sur colonne C₈, à partir du pic 2 obtenu par tamisage moléculaire (S-100).

La CLHP en phase reverse sur colonne de type C₈ s'avère être une étape indispensable à la séparation de ces protéines acides. L'éluion par un gradient linéaire eau/acétonitrile permet l'obtention de trois nouvelles fractions majeures à partir du pic 2 collecté par tamisage moléculaire (figure 59 p.137). L'analyse électrophorétique de ces protéines fait apparaître l'existence de plusieurs bandes de masses moléculaires différentes dans chacune de ces fractions (figure 60).

On dénote toutefois l'existence dans les fractions 2 et 3 d'une protéine majoritaire.

La co-élution des protéines pourrait s'expliquer par des propriétés physico-chimiques communes empêchant leur fractionnement sur ce type de colonne.

Nous avons tenté d'identifier ces protéines acides par séquençage de l'extrémité N-terminale selon le procédé de dégradation chimique d'Edman, directement sur la membrane de nitrocellulose. Nous avons ainsi pu démontrer que la protéine majoritaire présente dans le pic 2 et possédant une masse moléculaire de 40kDa correspond à une protéine décrite comme « protéine bovine de liaison aux protéoglycannes », d'origine cartilagineuse (*bovine chondrocyte proteoglycan link protein ; PLK*). En effet, le séquençage de 9

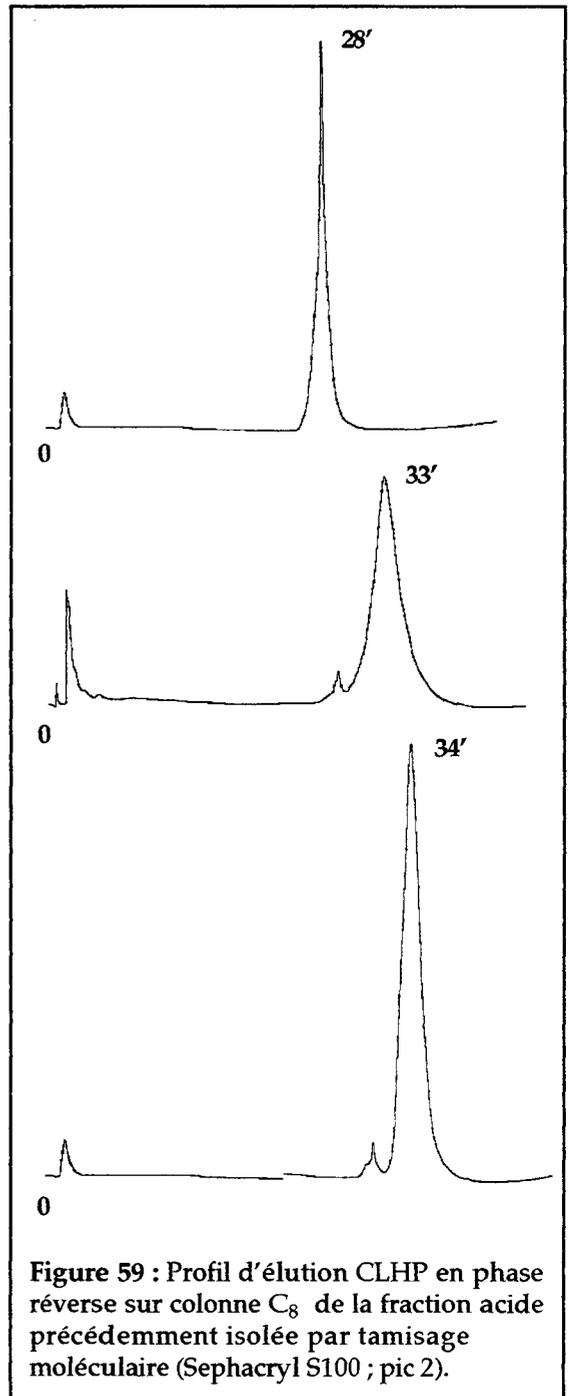


Figure 59 : Profil d'élution CLHP en phase inverse sur colonne C_8 de la fraction acide précédemment isolée par tamisage moléculaire (Sephacryl S100 ; pic 2).

protéine de 40kDa décrite par Hering [320]: $^1\text{HIQAEXGP??LV}^{12}$. La séquence primaire de la PLK bovine est décrite page suivante. A ce jour, les PLK humaine, bovine, de cheval, de poulet, de porc et de rat ont été clonées. Les PLK sont des glycoprotéines de 354-355 acides aminés possédant 2 sites de N-glycosylation et 2 sites de O-glycosylation potentiels. Le pourcentage d'homologie avec la PLK humaine est de 95% pour la PLK de poulet et 99% pour les autres (annexe p.178). Le pHi de la PLK bovine est de 7.22 (Serveur de Biologie moléculaire Expasy ; SWISS PROT). Connaissant le rôle biologique de la PLK qui est, dans le cartilage, de stabiliser l'aggrégation des protéoglycannes en interagissant spécifiquement

avec l'acide hyaluronique ou des protéoglycannes monomériques, il est logique de penser que la PLK se retrouve dans la fraction acide associée à un protéoglycane résiduel.

Les protéines de 33-35, 50, 55 et 65kDa sont non séquençables, en raison de la présence probable de chaînes glycaniques masquant l'extrémité N-terminale. La déglycosylation préalable de chacune de ces glycoprotéines s'avèrerait nécessaire, tant pour le séquençage de l'extrémité N-terminale que pour une digestion trypsique en gel de polyacrylamide suivie d'une analyse par spectrométrie de masse des peptides libérés.

```

1 MKSLLLLLULI SFCWAGHNSD NVTVDHDRV I HIQRENGPAL LUEREQAKVF 50
51 SRAGGNUTLP CKFYADPTAF GSGTAKIRIK WTKLTS DYLK EUDVFUSMGY 100
101 HKKTYGGYNG RVFLKGGSDN DRSLVITDLT LEDYGRYKCE VIEGLEDDTA 150
151 UVALDLQGVV FPYFFBLGAY NLNFHERQQA CLDQDAVIAS FDQLYDNRS 200
201 GLDUDNAGWL SDGSUQVPIT KPREPCGGQN TVAGUANVGF WDKDKSAVDV 250
251 FCFTSMFNGR FYYLIHPTKL TYDERVQACL NDGAQIAKVG QIFARWKLIG 300
301 YDRCDAGWLA DGSURYPISA FRARCSPSEA AVRFUGFPQK ENKLYGVYCF 350
351 RAVN 354

```

Séquence primaire de la PLK bovine:

Sites de glycosylation potentiels (N et S)

Homologie de la séquence peptidique obtenue par dégradation d'Edman.

E. ETUDE DE LA GLYCOSYLATION DES PROTEINES DE LA MATRICE ORGANIQUE DE L'OS

Bien que la littérature fasse état de l'existence de glycoprotéines dans la matrice organique de l'os, la glycosylation de ces dernières reste mal connue. Seule la glycosylation des protéines d'origine plasmatique, isolées de la circulation sanguine, est bien définie. C'est le cas de la fétuine bovine, de l' α_2 HS glycoprotéine humaine, de la transferrine ou de certaines immunoglobulines qui sont toutes des glycoprotéines sériques bien étudiées et retrouvées à des concentrations plus ou moins élevées dans le tissu osseux.

Pour ce qui est des protéines spécifiques à l'os, la sialoprotéine osseuse (BSP), dont la partie glycanique représente 50% de son poids, est l'unique glycoprotéine dont les chaînes glycaniques ont fait l'objet d'une étude structurale [160].

C'est probablement l'extrême difficulté d'isolement de ces glycoprotéines à partir de la matrice organique de l'os qui a limité l'étude de la glycosylation.

Dans le but de recueillir des informations sur la nature de la glycosylation des protéines de l'os, notre étude a adopté une stratégie globale consistant en la purification et la caractérisation des oligosaccharides majeurs libérés par coupure chimique à partir du pool de protéines non collagéniques de la fraction (B).

E.I. UTILISATION DE LECTINES POUR L'IDENTIFICATION DES GLYCANNES PRESENTS A LA SURFACE DES GLYCOPROTEINES

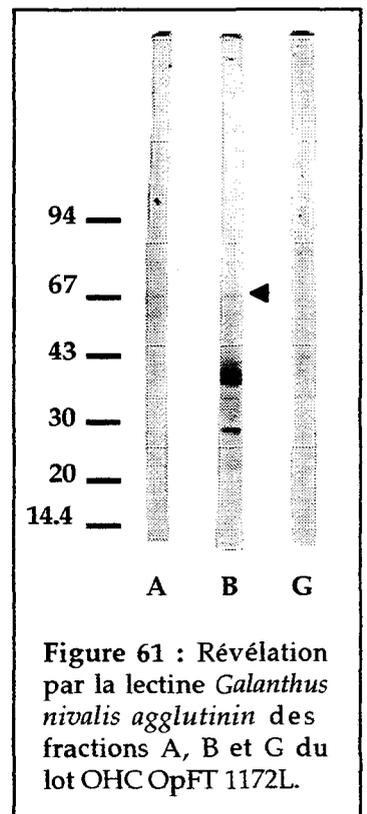
Les lectines sont des protéines ou glycoprotéines d'origine végétale, animale, bactérienne ou virale, n'appartenant pas à la classe des immunoglobulines, ne possédant pas d'activité enzymatique, capables de fixer de façon spécifique mais non covalente sur certains oses, dérivés d'oses ou glycanes. Pour ces raisons, elles sont couramment utilisées pour l'identification des structures glycaniques présentes à la surface des glycoprotéines.

Les lectines que nous avons utilisées pour la caractérisation de ces chaînes glycaniques ont des spécificités de réactions diverses résumées dans le **tableau 11** (p.140).

<i>Galanthus nivalis agglutinin</i> (GNA)	Mannose lié en $\alpha 1,3$, $\alpha 1,6$ ou $\alpha 1,2$. Sur l'extrémité des chaînes glycaniques. Spécifique des chaînes à mannose N-liées à la protéine.
<i>Sambuccus nigra agglutinin</i> (SNA)	Acide sialique lié en $\alpha 2,6$ sur un résidu de galactose ou de N-acétylglucosamine. Spécifique des chaînes complexes N-liées à la protéine. Spécifique d'acide sialique lié en $\alpha 2,6$ sur des structures O-glycaniques.
<i>Maackia amurensis agglutinin</i> (MAA)	Acide sialique lié en $\alpha 2,3$ sur un résidu de galactose des chaînes glycaniques O- ou N-liées. Type de liaison peu répandu à la surface des N-glycosylprotéines.
<i>Peanut agglutinin</i> (PNA)	Galactose lié en $\beta 1,3$ sur un résidu de N-acétyl-galactosamine. Spécifique des O-glycannes (noyau de type 1).

Tableau 11 : Spécificité de réaction de différentes lectines végétales.

La figure 61 illustre les révélations par la GNA des fractions obtenues par déminéralisation à partir de la préparation industrielle OHC OpFT 1172L, après électrophorèse (SDS-PAGE) réalisée en conditions réductrices. La fraction (A) correspondant aux protéines de haut poids moléculaire de type collagène n'est pas révélée par cette lectine, alors que la fraction (B) (protéines non collagéniques) se caractérise par la présence de glycoprotéines possédant des glycanes de type oligomannosidique. En particulier, on observe la révélation d'une bande majeure à 39kDa pouvant correspondre à l'ostéonectine. Parmi les révélations mineures, on note une bande à 67kDa susceptible d'être la fétuine bovine et/ou l' α_2 HS glycoprotéine. Ces résultats



confirment des résultats antérieurs laissant suggérer l'existence de tels glycanes sur ces glycoprotéines [271] (figures 64 p.142).

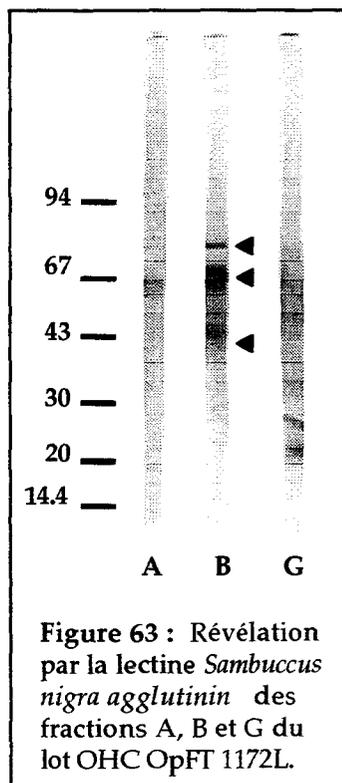
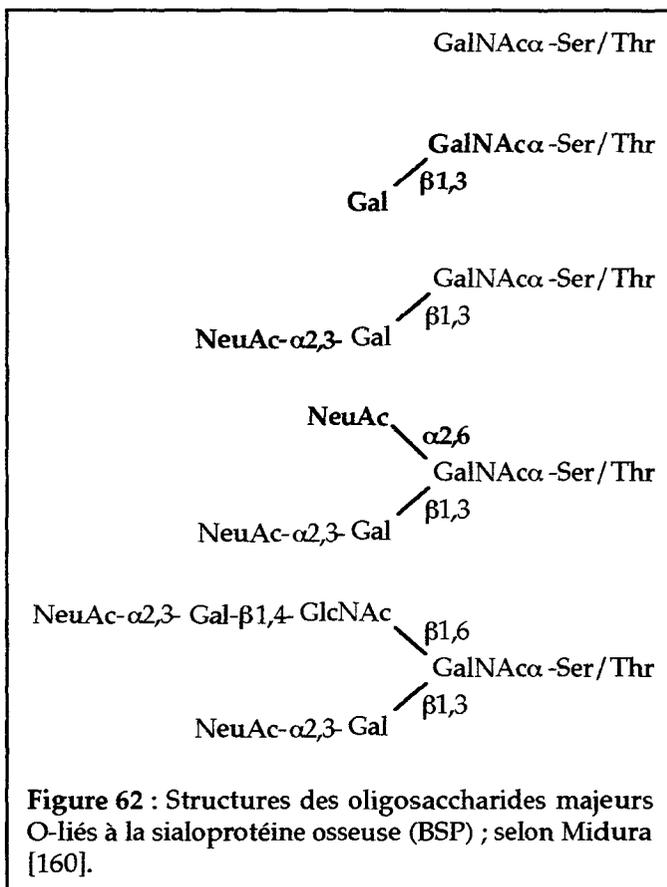
Bien que le nombre de bandes révélées par cette lectine dans les fractions (B) et (G) soit faible, on retiendra qu'il existe dans l'OHC des structures oligomannosidiques N-liées aux protéines, parmi lesquelles se trouvent vraisemblablement les protéines d'intérêt à 67kDa

(fétuine bovine et/ou α_2 HS glycoprotéine) et à 39kDa (ostéonectine).

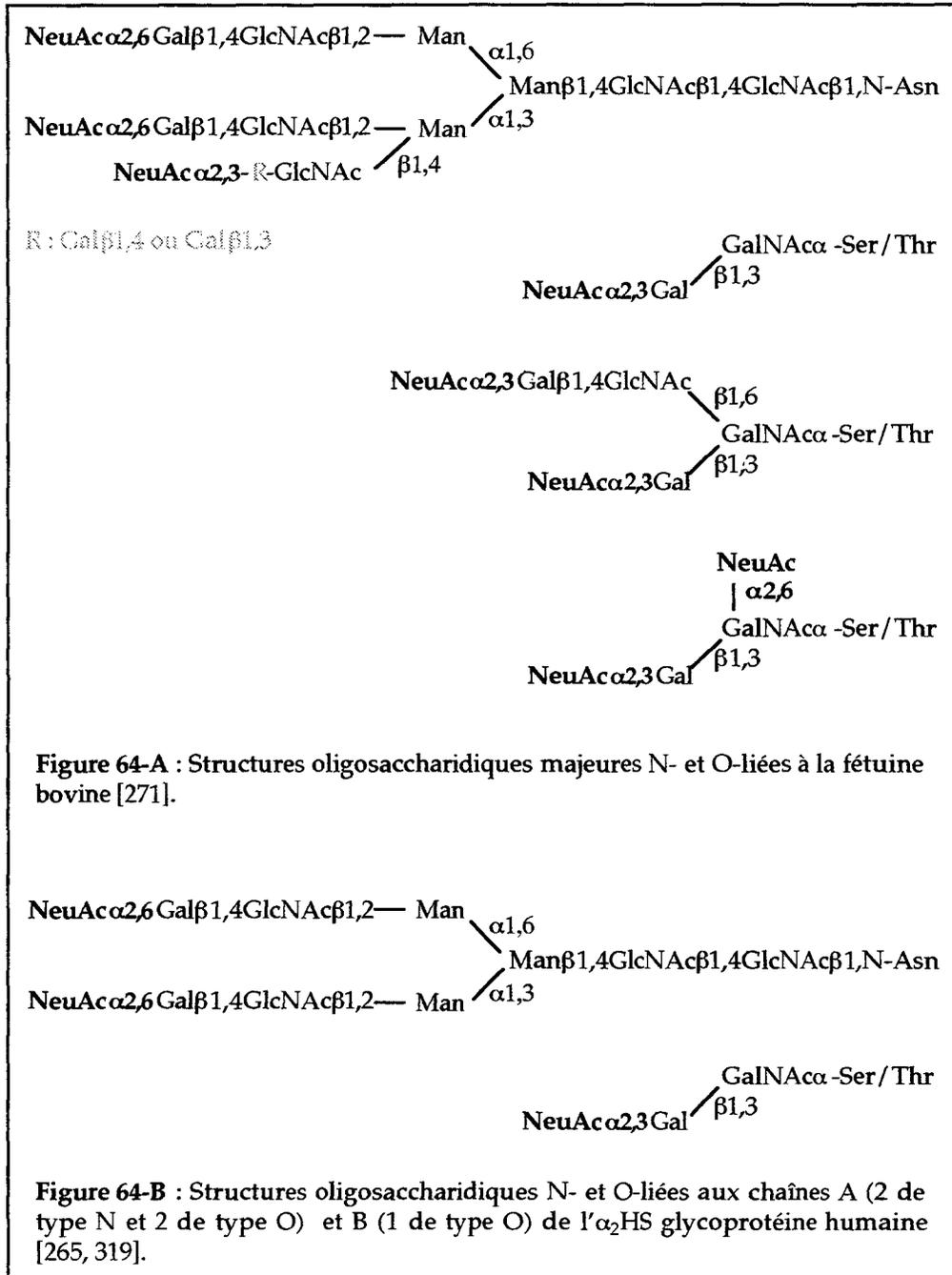
Les glycoprotéines acides connues dans l'os pour porter sur leurs chaînes glycaniques un ou plusieurs résidus d'acide sialique sont l'ostéonectine, la sialoprotéine osseuse BSP, l'ostéopontine et la BAG-75. Les pourcentages des acides sialiques de ces glycoprotéines sont respectivement de 3%, 12%, 5% et 7%.

La révélation par la lectine SNA (**figure 63**) fait apparaître un profil différent de

celui obtenu avec la lectine GNA. L'intensité de révélation des bandes laisse suggérer que les glycoprotéines de la fraction (B) portent en majorité un ou plusieurs résidus d'acide sialique liés en $\alpha_2,6$. C'est le cas pour les sialoprotéines et phosphoprotéines telles que l'ostéopontine et la sialoprotéine osseuse BSP, dont les migrations électrophorétiques sont comprises entre 65 et 80kDa en conditions réductrices et dont les sites de glycosylation sont essentiellement de type O-glycosidique. Or, on observe la révélation de différentes bandes dans cette zone de migration. Concernant la sialoprotéine osseuse BSP, ces résultats sont en accord avec ceux de Midura en 1996 [160] qui décrit les chaînes glycaniques majeures comme des O-glycannes portant un ou plusieurs résidus d'acide sialique (**figure 62**).



De même, l'ostéonectine à 39kDa semble révélée par la SNA. On note également la révélation de plusieurs bandes à 67kDa pouvant correspondre, en plus des



phospho/sialoprotéines, à la fétuine bovine et/ou l' α_2 HS glycoprotéine. La présence d'acide sialique lié en α 2,6 sur les chaînes N-glycanniques de ces glycoprotéines est d'ailleurs connue [265, 271, 321] (figures 64-A et -B).

Le profil obtenu par révélation avec la lectine MAA (figure 65 p.143) est particulièrement intéressant, en raison de l'originalité du type de liaison de l'acide sialique (α 2,3) sur les chaînes glycanniques des glycoprotéines. Dans la fraction (B), les glycoprotéines révélées

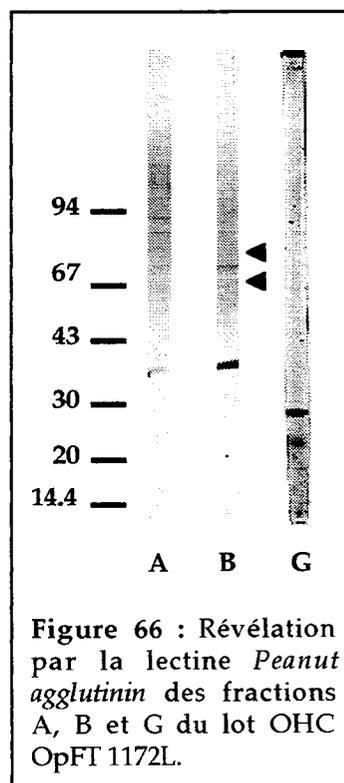
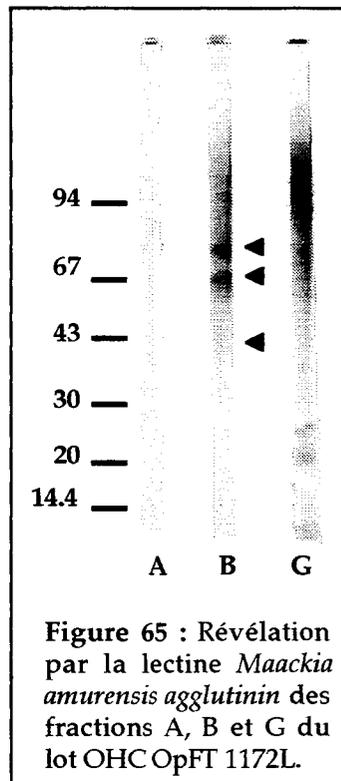
ont une masse moléculaire comprise entre 30 et 150kDa. En particulier, on retrouve vraisemblablement l'ostéonectine à 39kDa (faible intensité de révélation), les phospho/sialoprotéines comprises entre 65 et 80kDa, correspondant à l'ostéopontine, la BAG-75 et la sialoprotéine osseuse BSP, et, si elle est présente, la fétuine bovine (figure 64-A p. 142). La fraction protéines cellulaires (G) présente quant à elle, à la fois des glycoprotéines de faibles masses et de masses moléculaires supérieures à 100kDa révélées positivement.

Globalement, en accord avec les résultats obtenus avec la SNA, on retrouve dans les fractions protéines non collagéniques (B) et

protéines cellulaires (G) un grand nombre de glycoprotéines portant des chaînes glycaniques acides. Il semble donc que la majeure partie des glycoprotéines de l'os dont l'ostéonectine, la sialoprotéine osseuse, l'ostéopontine et la BAG-75 renferment au moins un résidu d'acide sialique sur leurs chaînes glycaniques.

La PNA est spécifique des glycoprotéines dont la chaîne glycanique porte un noyau disaccharidique caractéristique des O-glycosylprotéines. Les fractions protéiques (B) et (G) se caractérisent par une grande hétérogénéité de glycoprotéines de masses moléculaires supérieures à 50kDa révélées par la PNA (figure 66). Ce résultat est contraire à celui obtenu avec la GNA, laissant suggérer que la majorité des protéines de haut poids moléculaire de l'OHC portent des chaînes glycaniques O-liées.

L'utilisation de ces lectines comme outil de révélation des glycoprotéines confirme l'existence de nombreuses glycoprotéines de masses moléculaires variables, dans chacune



des fractions (B) et (G) obtenues à partir du lot OHC OpFT 1172L. Ces glycoprotéines sont à la fois N- et O-glycosylées avec une prépondérance de O-glycannes sialylés, notamment par des résidus d'acides sialiques liés en $\alpha 2,3$.

Pour parfaire cette étude globale de la glycosylation des glycoprotéines osseuses, l'étape suivante a consisté en la caractérisation de structures glycaniques purifiées par hydrolyse chimique de la fraction protéique (B).

E.II. COMPOSITION MOLLAIRE EN MONOSACCHARIDES DE LA PREPARATION OHC

La composition glucidique globale de la fraction (B) du lot OHC OpFT 1172L a été effectuée par identification des monosaccharides libérés par hydrolyse acide (méthanolyse) et chromatographie en phase gazeuse. Ces monosaccharides représentent 16% de la masse pesée et sont les suivants : galactose, mannose, glucose, N-acétyl-glucosamine, N-acétyl-galactosamine, acide N-acétyl-neuraminique et des traces d'acides uroniques, de xylose et de fucose. Les taux calculés sur la base de 3 mannoses ou d'un galactose sont présentés ci-dessous :

Fuc	Xyl	UA	Gal	Man	Glc	GalNAc	GlcNAc	NeuAc
traces	1,27	traces	7,50	3,00	4,65	5,85	4,2	0,90
traces	0,17	traces	1,00	0,40	0,62	0,78	0,56	0,12

La présence simultanée de mannose et de N-acétyl-galactosamine confirme l'existence de chaînes N- et O-glycaniques. Les chaînes O-glycaniques semblent prépondérantes. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus précédemment par les révélations lectiniques.

Les traces d'acides uroniques sont en faveur de la présence résiduelle de chaînes de glycosaminoglycannes, donc de protéoglycannes dans la fraction (B) correspondant aux protéines non collagéniques. Enfin, étant donnée l'hétérogénéité protéique de cette fraction, le taux d'acide sialique reste élevé et demeure significatif de la présence de nombreuses glycoprotéines acides dans la matrice organique de l'os. Il est logique de penser que l'essentiel de l'acide sialique est associé aux phospho/sialoprotéines précédemment décrites (sialoprotéine osseuse, ostéopontine, ostéonectine...). Ces chaînes

glycanniques sialylées pourraient donc participer au mécanisme de reconnaissance et d'adhérence attribué à ces glycoprotéines acides.

E.III. ETUDE DE LA GLYCOSYLATION DES PROTEINES TOTALES DE L'OHC

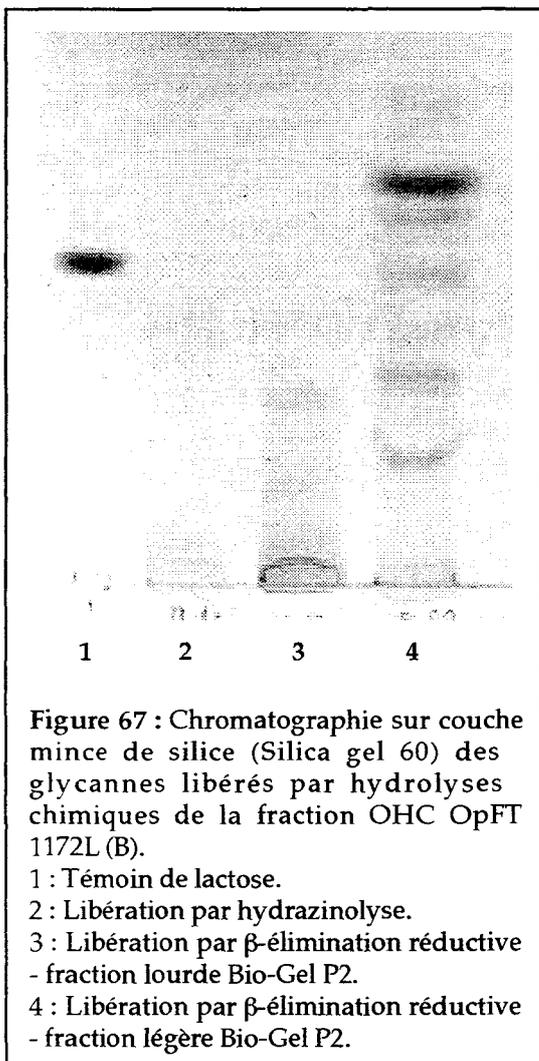
Les résultats obtenus par composition molaire en monosaccharides mettent en avant la présence de N- et O-glycannes dans la préparation avec, toutefois, une prépondérance de O-glycannes (indiqué par le taux élevé de GalNAc). Ce résultat est renforcé d'une part, par le nombre élevé de glycoprotéines révélées par la PNA et, d'autre part, par la faible quantité de matériel glucidique libérée par hydrazinolyse (libération spécifique des N-glycannes, **figure 67**). Ces éléments ont guidé la stratégie employée pour

la libération des glycannes dans le but de leur étude structurale ultérieure. Il nous a semblé judicieux de privilégier la libération des O-glycannes sous forme d'oligosaccharides alditols par dégradation alcaline en conditions réductrices (β -élimination). Cette méthode permet par ailleurs d'obtenir les N-glycannes sous forme de glycopeptides.

Deux protocoles expérimentaux ont été utilisés :

- le premier a consisté en un traitement alcalin direct de la préparation, associé à l'addition d'EDTA dans le milieu afin d'assurer la dissociation des protéines de la matrice minérale et permettre ainsi leur solubilisation ;

- dans un second protocole, nous avons fait précéder le traitement alcalin par une protéolyse



exhaustive à l'aide de la pronase, ce traitement pronasique ayant également pour but une dissociation des protéines de la matrice minérale avec formation de glycopeptides solubles (notamment O-glycosyl peptides). Une précipitation sélective des glycopeptides à l'éthanol

élimine les sels minéraux ainsi que les peptides libérés (restants dans le surnageant), ce qui permet un enrichissement en matériel glucidique avant la β -élimination.

Notre étude a tout d'abord porté sur les oligosaccharides alditols libérés par dégradation alcaline. Après dessalage, le pool total des oligosaccharides est analysé par

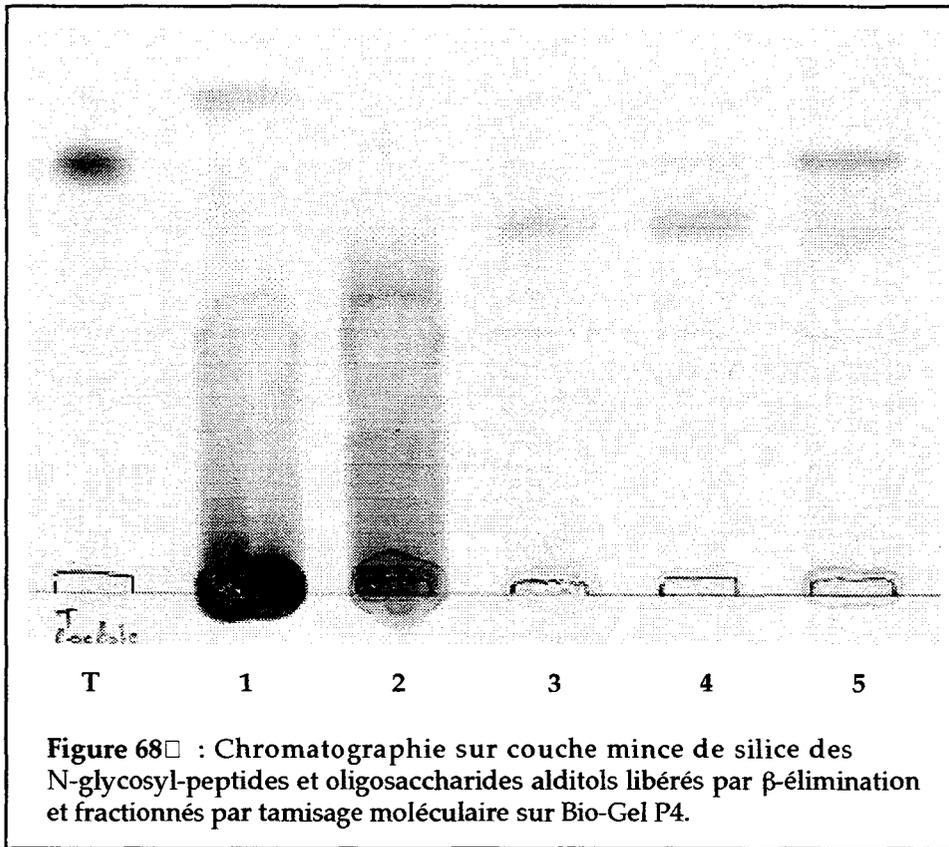


Figure 68 : Chromatographie sur couche mince de silice des N-glycosyl-peptides et oligosaccharides alditols libérés par β -élimination et fractionnés par tamisage moléculaire sur Bio-Gel P4.

chromatographie sur couche mince de silice.

Le profil chromatographique fait apparaître une grande hétérogénéité du matériel libéré, avec notamment une fraction de haut poids moléculaire (ne migrant pas) et pouvant correspondre

aux N-glycosyl peptides, ainsi que différents oligosaccharides alditols (figure 68). La comparaison de la migration chromatographique avec le témoin lactose (T) permet de penser que les chaînes des oligosaccharides sont constituées de deux à dix monosaccharides.

Afin d'obtenir une première séparation des oligosaccharides en fonction de leur masse moléculaire, une étude chromatographique basée sur le tamisage moléculaire (sur gel de type Bio-Gel P4) est introduite. Ce fractionnement permet l'obtention de cinq fractions oligosaccharidiques numérotées de 1 à 5 dans l'ordre décroissant des masses moléculaires.

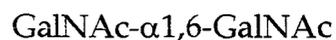
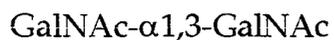
Les fractions 3, 4 et 5 sont analysées quant à leur contenu en monosaccharides :

	Fuc	Gal	Man	Glc	GalNAc	GlcUA	GalNAcitol
Fraction 3	-	5,00	-	10,00	-	-	1,00
Fraction 4	-	3,00	0,39	1,59	0,78	0,03	1,00
Fraction 5	1,08	1,00	0,73	1,49	-	-	-

Les fractions 3, 4 et 5 se caractérisent par la présence de galactose, mannose (faible), N-acétyl galactosamine, N-acétyl galactosaminitol et de traces d'acide glucuronique. L'absence de N-acétyl glucosamine et la faible quantité de mannose indiquent que ces fractions correspondent essentiellement à des O-glycannes. Plusieurs constatations peuvent être faites au vu de cette composition :

- 1) l'élément notable est l'absence d'acide sialique. Des tentatives de fractionnement réalisé sur colonne échangeur d'anions (Dowex 1x2) ont cependant montré le caractère fortement acide de ces fractions. Il est probable que cette acidité soit le reflet de la présence d'aglycones anioniques sur ces oligosaccharides, tels des résidus de sulfate ou de phosphate. La présence d'acide glucuronique peut également contribuer à cette acidité. Des études ultérieures devraient nous permettre de confirmer les éléments structuraux et de montrer si l'acide glucuronique fait partie intégrante des chaînes O-glycanniques.

- 2) en plus de la N-acétyl galactosaminitol, on note la présence de N-acétyl galactosamine non réduite. Cette dernière peut témoigner de la présence de noyaux oligosaccharidiques de type 5 ou de type 8 des mucines.

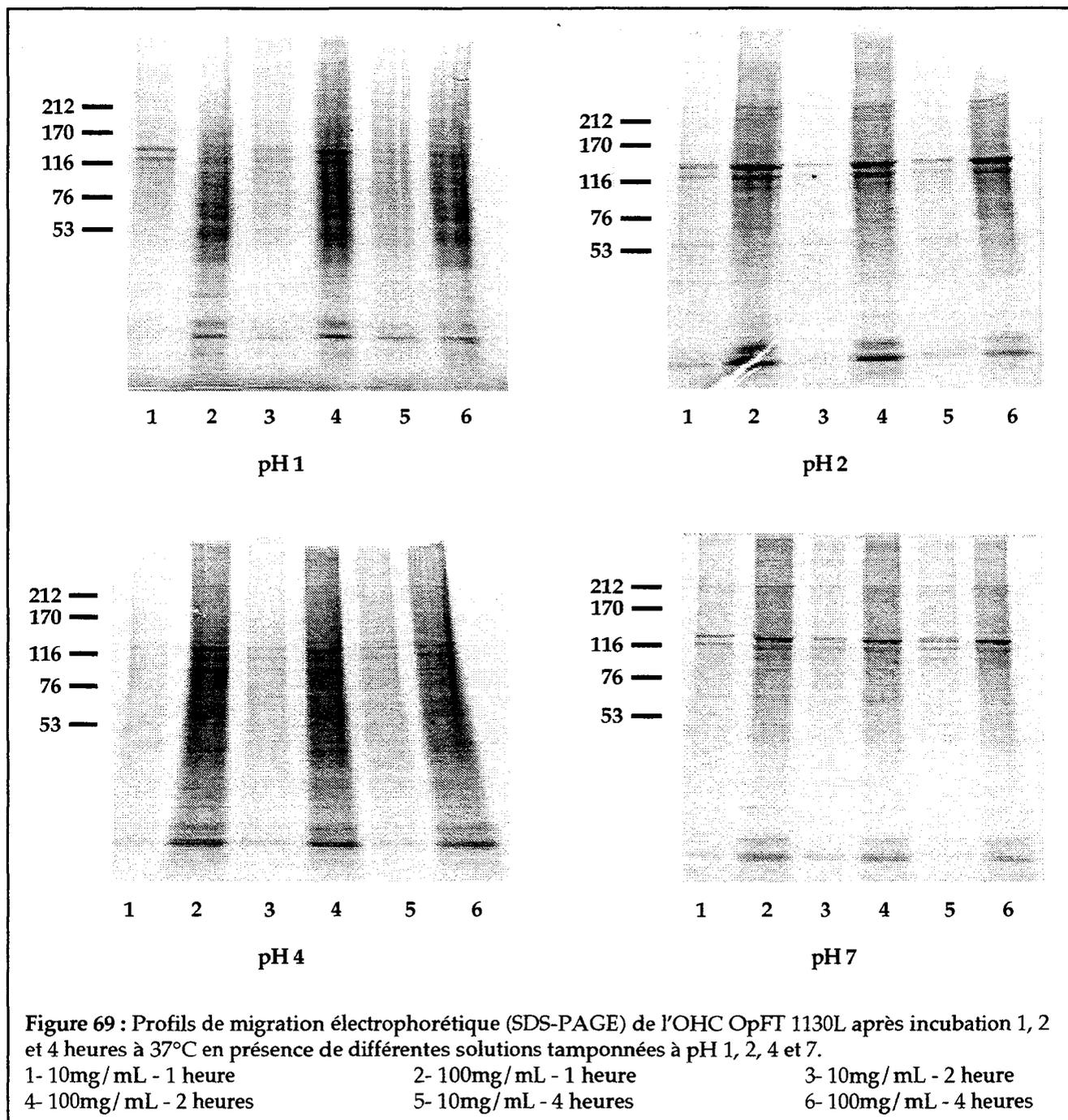


L'autre hypothèse serait l'existence de la séquence oligosaccharidique Lac diNAc (GalNAc- β 1,4-GlcNAc) déjà décrite dans les protéines bovines, mais cette hypothèse semble infirmée par l'absence de N-acétyl glucosamine dans ces fractions.

- 3) le taux élevé de galactose pourrait s'expliquer par la présence de l'antigène de Galili (Gal- α 1,3-Gal) au sein des O-glycannes. Cet antigène est caractéristique des tissus animaux.

F. ETUDE DE LA STABILITE DE LA PREPARATION OHC EN FONCTION DU PH ET EN PRESENCE D'EXTRAITS GASTRIQUES ET DUODENAUX HUMAINS - PREPARATION D'UN ANTICORPS POLYCLONAL ANTI-OHC (B)

La préparation industrielle de l'OHC est une poudre médicamenteuse administrée par voie orale. Aussi, une étude cinétique d'hydrolyse chimique des protéines de l'OHC est réalisée à différentes valeurs de pH proches de celles de l'appareil gastrique et du tube digestif.



La **figure 69** correspond aux analyses électrophorétiques des fractions concentrées à 10 et 100mg/mL du lot OHC OpFT 1130L à pH1, 2, 4 et 7, après 1, 2 et 4 heures d'incubation à

37°C. Quels que soient le pH et la concentration en OHC, aucune variation significative de migration électrophorétique n'est observée. On retrouve dans chacune de ces fractions les familles majeures de protéines de la matrice organique du tissu osseux décrites précédemment. Toutefois, la présence importante de sels ne permet pas une bonne révélation de ces protéines, en particulier celles de hautes masses moléculaires (>150kDa). Globalement les variations de pH ne semblent pas ou peu influencer les migrations électrophorétiques des protéines de l'OHC. De plus, la durée d'incubation n'a aucun effet visible sur le profil de migration. Les protéines de l'OHC seraient donc insensibles à une hydrolyse chimique.

Afin de se placer dans des conditions proches du milieu digestif humain, les expériences sont reproduites avec des extraits gastriques et duodénaux humains. En raison de l'abondance du contenu protéique de ces milieux, un simple suivi électrophorétique de l'hydrolyse des protéines osseuses ne permet pas l'observation de variations de migration de ces protéines. Seule une immunorévélation par un anticorps polyclonal anti-OHC (B) permettrait le suivi des protéines spécifiques du tissu osseux.

La poudre d'OHC correspond à une matrice organique et à une matrice minérale phosphocalcique insoluble, non injectable. La fraction protéique (B) correspondant aux protéines non collagéniques obtenues par déminéralisation, est choisie pour la production des anticorps polyclonaux. Les analyses par chromatographie en phase gazeuse ont révélé (**figure 70-A p.150**) la présence de sels d'EDTA-Na₂ en quantité abondante dans la fraction (B). Etant donné le caractère toxique de l'EDTA-Na₂, un dessalage sur colonne de gel filtration suivi d'une étape d'ultrafiltration ont permis l'obtention de matériel protéique injectable, dépourvu en sels (**figure 70-B p.150**).

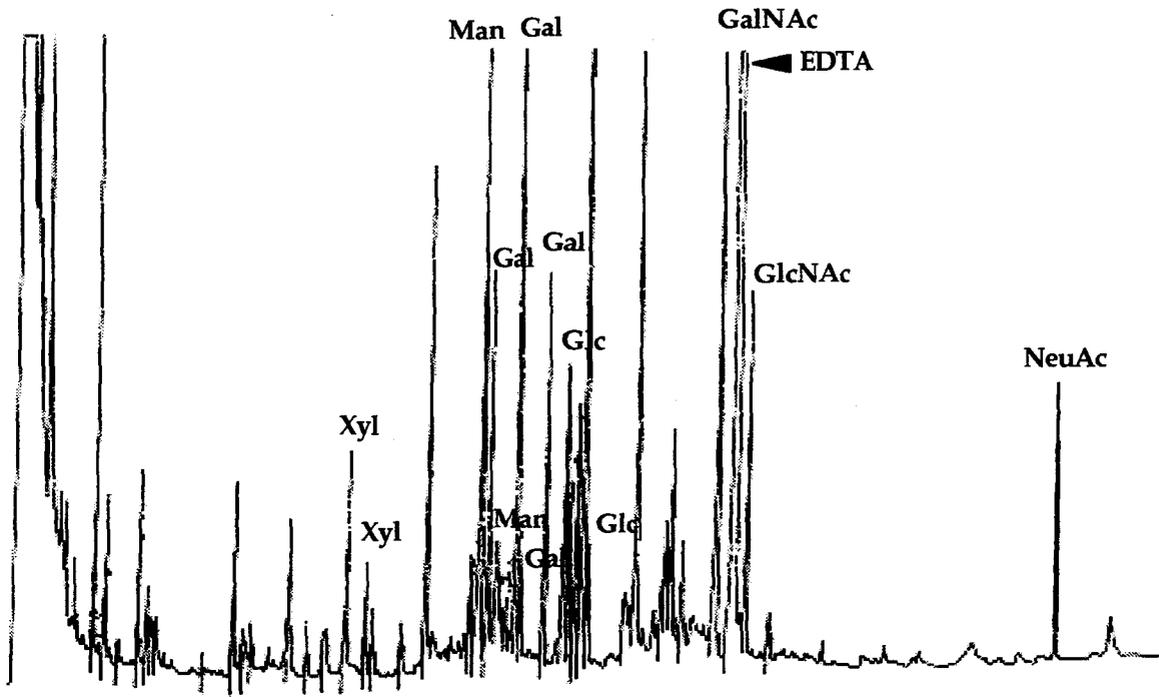


Figure 70-A : Chromatographie en phase gazeuse de la fraction OHC OpFT 1045L (B).

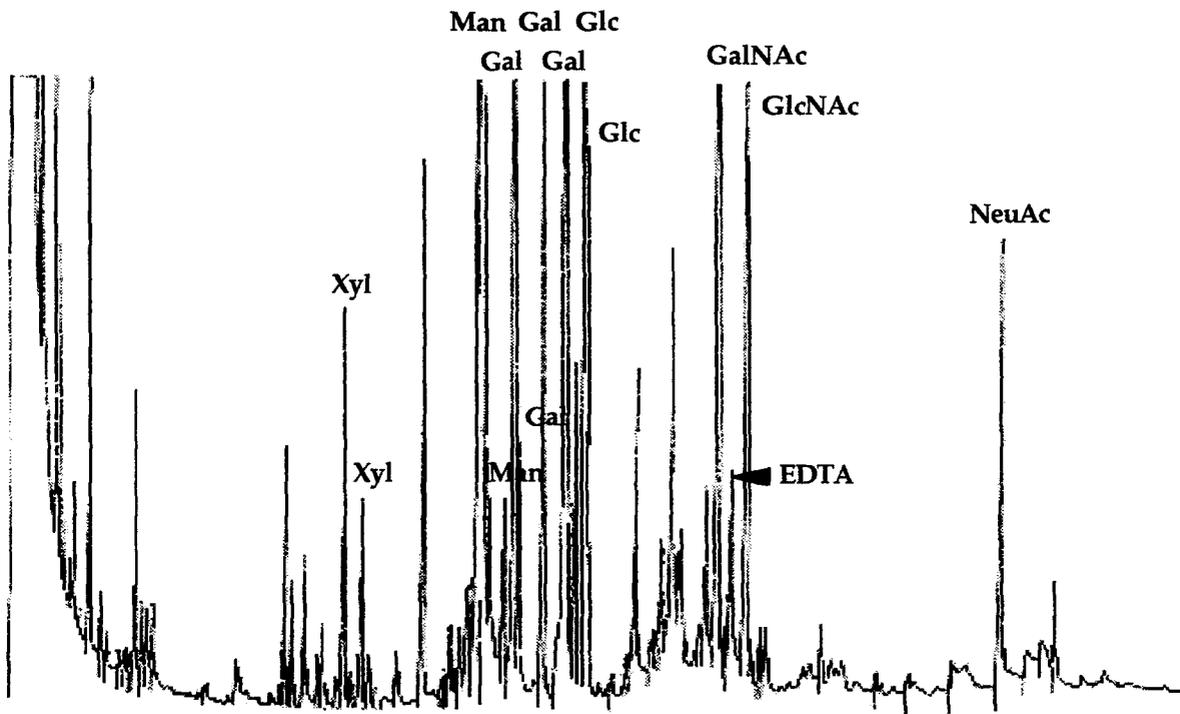
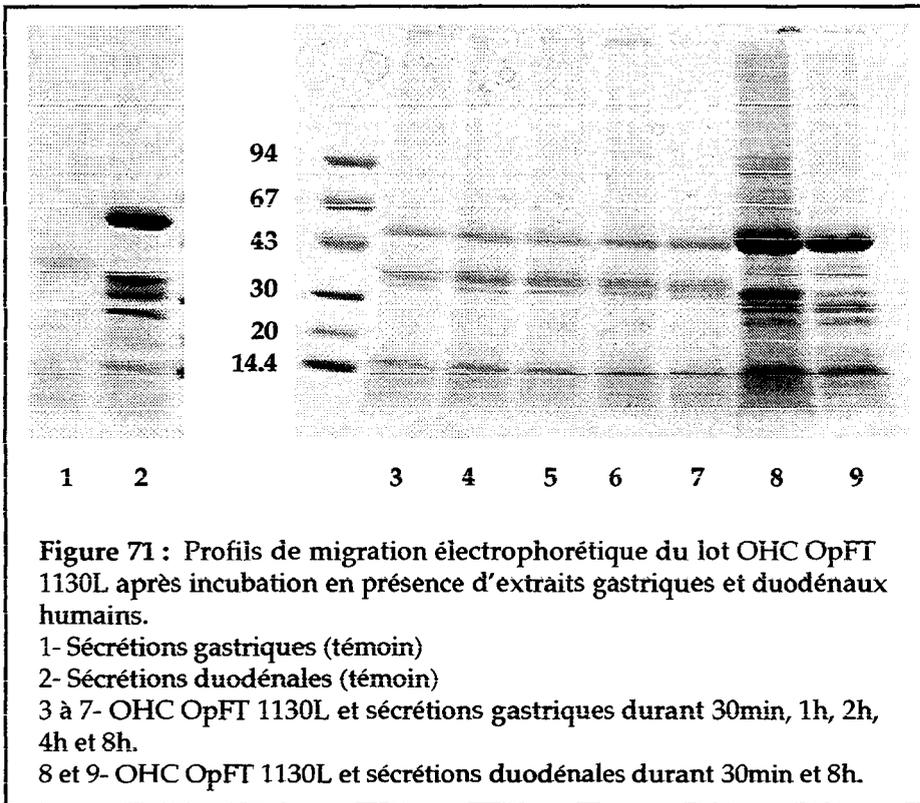


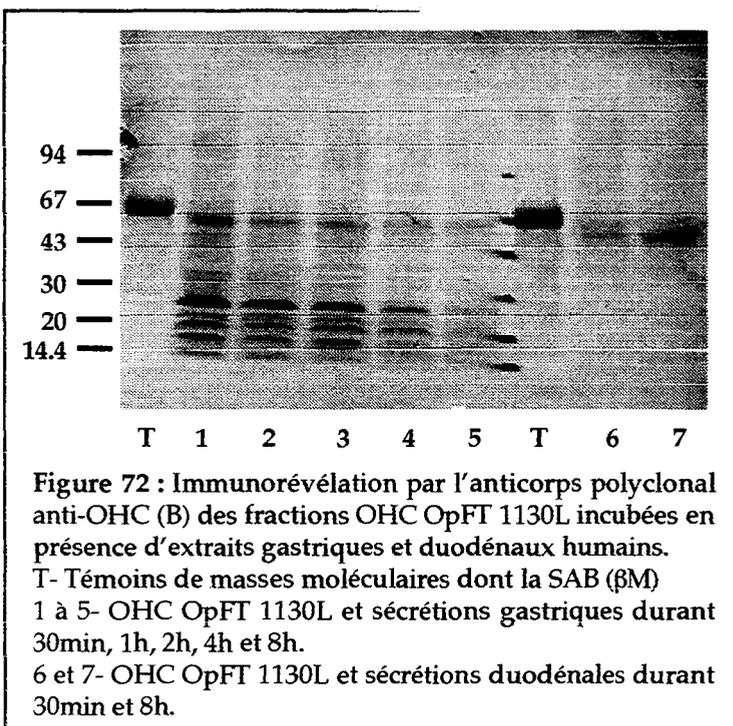
Figure 70-B : Chromatographie en phase gazeuse de la fraction OHC OpFT 1130L (B) après dessalage sur Bio-Gel P2 (acide acétique 1%).

Les révélations au bleu de Coomassie des migrations électrophorétiques (SDS-PAGE) des protéines du lot OHC OpFT 1130L incubé en présence des extraits gastriques et duodénaux sont présentés sur la **figure 71**. On note la présence d'une protéine majeure à 35kDa (probablement la pepsine)



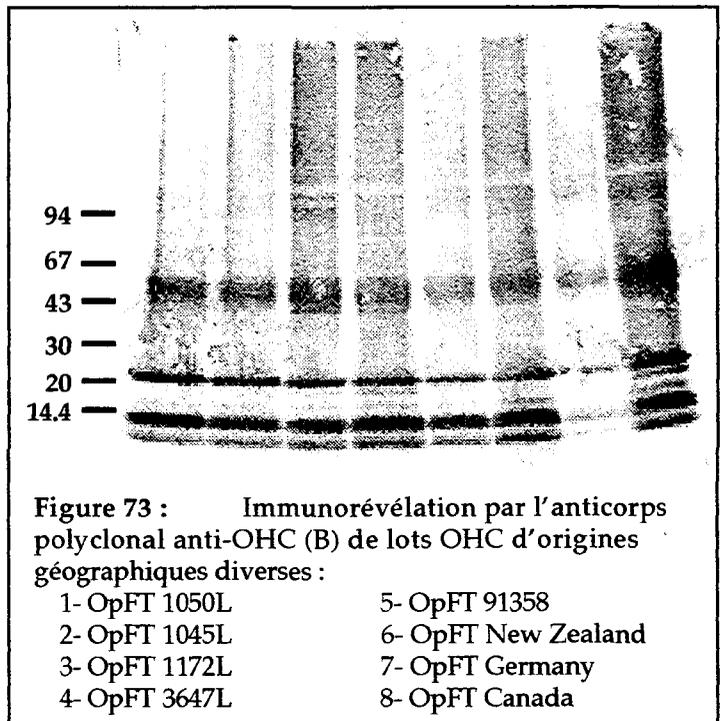
dans le témoin correspondant aux sécrétions gastriques et une protéine à 55kDa pouvant correspondre à l'albumine humaine dans les sécrétions duodénales. On retrouve essentiellement ces différentes protéines dans les fractions OHC obtenues après incubations en présence des sécrétions gastriques et duodénales. Ces résultats ne

permettent donc pas l'identification et l'analyse des variations de migration des familles protéiques osseuses. Cependant, après électro-transfert sur membrane de nitrocellulose et immunorévélation par l'anticorps anti-OHC (B), on retrouve (**figure 72**), en ce qui concerne les incubations gastriques, les familles majeures de protéines de la matrice organique de



l'os. Toutefois, au cours de la cinétique d'incubation, on observe une nette diminution de l'intensité de révélation, suggérant qu'au cours du temps il y aurait hydrolyse partielle des protéines. D'autre part, le milieu d'incubation influence qualitativement les profils de migrations électrophorétiques puisqu'en présence des sécrétions duodénales, seules une ou plusieurs protéines à 55kDa sont révélées par l'anticorps anti-OHC (B). Il est très probable que cette bande à 55kDa corresponde à l'albumine humaine. En effet, on connaît les fortes homologues structurales des albumines humaine et bovine, si bien que l'albumine humaine est sensible à l'anticorps polyclonal anti-OHC (B). Ainsi, dès 30 minutes d'incubation en présence d'extraits duodénaux, la totalité des protéines osseuses est digérée.

En conclusion, l'anticorps polyclonal anti-OHC (B) affiche une haute spécificité de réaction pour les protéines et glycoprotéines de l'OHC (une immunorévélation par cet anticorps polyclonal anti-OHC (B) de différents lots d'origines géographiques diverses est représentée **figure 73**). Les variations de temps et le milieu d'incubation influencent de façon significative les



migrations électrophorétiques de ces protéines. Ainsi, les incubations gastriques acides ont seulement un effet à long terme sur les structures moléculaires des protéines majeures observées dans l'OHC. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus après incubation à différents pH où, même à pH très acide, aucune hydrolyse protéique n'est visible. Par contre, les incubations duodénales neutres (pH7.0) ont un effet hydrolytique rapide sur les protéines osseuses. Cette hydrolyse est le résultat de l'action de l'ensemble des protéines enzymatiques propres aux sécrétions duodénales.

Les familles de protéines osseuses semblent donc avoir été les cibles digestives des enzymes présents à forte concentration dans les sécrétions duodénales, alors qu'elles sont peu sensibles aux hydrolyses chimiques d'origine exogène ou gastrique.

Conclusion

Notre étude avait pour but de définir biochimiquement la préparation industrielle OHC, notamment d'un point de vue composition en protéines.

Nous avons ainsi standardisé différentes méthodes biochimiques tels le dosage des protéines et l'analyse électrophorétique qui, dans l'avenir, permettront un contrôle direct des lots.

L'isolement et la caractérisation des protéines ou glycoprotéines majeures ont été effectués. La mise au point d'une technique d'isolement sélectif des protéines à partir de la matrice minérale nous a permis de discriminer trois familles distinctes de protéines :

- les protéines de haut poids moléculaire correspondant aux protéoglycannes et aux protéines « collagène-like »
- les protéines correspondant aux protéines cellulaires et sériques
- les protéines non collagéniques de masses moléculaires comprises entre 10 et 100kDa, associées à la matrice organique osseuse.

Diverses protéines, antérieurement décrites comme associées à l'os, ont aussi pu être partiellement purifiées. En outre, cette étude nous a permis de positionner ces protéines de façon certaine sur les électrophorogrammes. L'identification de ces protéines constituera dans l'avenir un élément de contrôle de lots d'origines géographiques diverses, par mesure de la concentration de protéines marqueurs telles l' α_2 HS glycoprotéine, les phospho/sialoprotéines ou l'ostéocalcine. Une protéine mineure, la « protéine de liaison aux protéoglycannes » (PLK) a, en particulier, été caractérisée par séquençage direct de l'extrémité N-terminale sur membrane de nitrocellulose.

Par ailleurs, l'obtention d'une fraction protéique enrichie nous a permis la production d'un anti-sérum polyclonal spécifique de ces protéines. Cet anti-sérum a été exploité pour déterminer le devenir des protéines osseuses au contact des différents sucs digestifs. Nous avons ainsi pu démontrer que ces protéines étaient stables dans le milieu stomacal, mais qu'elles subissent une protéolyse exhaustive dans le liquide duodéal, protéolyse en accord avec l'assimilation intestinale de ces protéines.

En dehors de l'étude réalisée sur les protéines, nous avons défini la préparation OHC tant d'un point de vue de la composition glucidique que glycolipidique. En particulier, un glycolipide résiduel, le Gg3, trouvant une origine probable dans la moelle osseuse, a été caractérisé dans la préparation. Ce glycolipide neutre constitue un intermédiaire de biosynthèse des gangliosides tétra-sialylés qui, quant à eux, n'ont pu être caractérisés.

L'étude du matériel glucidique confirme l'existence de nombreuses glycoprotéines dans l'os. L'étude plus précise de la glycosylation de ces glycoprotéines prouve qu'elles possèdent des N-glycannes (oligomannosidiques et di-acétyl-lactosaminiques), mais se distinguent par une abondance de chaînes O-glycosidiques. Un début de caractérisation de ces chaînes glycosidiques a été entrepris après leur isolement par traitement alcalin réducteur.

Il est probable que la glycosylation des protéines constitue un élément essentiel dans leur adhésion à la matrice minérale, et notamment aux ions calciques.

Ce travail sera poursuivi dans le but de caractériser des séquences glycaniques qui pourraient être représentatives du tissu osseux. Certaines protéines « mucine-like » telle la sialoprotéine osseuse ou d'autres phospho/sialoprotéines devraient faire l'objet d'une étude de glycosylation sélective.

Références bibliographiques

- 1 Frost H.M. (1964) **Dynamics of bone remodelling** *Bone dynamics*, Little, Brown and co, Boston 315-33
- 2 Parfitt A.M. (1984) **The cellular basis of bone remodeling. The quantum concept re-examined in light of recent advances in cell biology of bone** *Calcif. Tissue Int.* 36, 37-45
- 3 Göthlin G. and Ericsson J.L.E. (1976) **The osteoclast : review of ultrastructure, origin and structure-function relationship** *Clin. Orthop. Relat. Res.* 120, 201-31
- 4 Marks S.C. (1983) **The origin of the osteoclast** *J. Oral Pathol.* 12, 226-56
- 5 Vaes G. (1988) **Cellular biology and biochemical mechanism of bone resorption. A review of recent developments on the formation, activation and mode of action of osteoclasts** *Clin. Orthop. Rel. Res.* 231, 239-71
- 6 Loutit J.F. and Nisbet N.W. (1982) **The origin of the osteoclast** *Immunology* 161, 193-203
- 7 Mbalaviele G., Chen H. and Boyce B.F. (1995) **The role of cadherin in the generation of multinucleated osteoclasts from mononuclear precursors in murine marrow** *J. Clin. Invest.* 95, 2757-65
- 8 Walker D.G. (1975) **Bone resorption restored in osteopetrotic mice by transplants of normal bone marrow and spleen cells** *Science* 190, 784-6
- 9 Teitelbaum S.L. and Kahn A.J. (1980) **Mononuclear phagocytes, osteoclasts and bone resorption** *Mineral Electrol. Metabol.* 3, 2-9
- 10 Nijweide P.J., Burger E.H. and Feyen J.H.M. (1986) **Cells of bone : proliferation, differentiation and hormonal regulation** *Physiol. Rev.* 66, 855-86
- 11 Burger E.H., Van der Meer J.W.M. and Nijweide P.J. (1984) **Osteoclast formation from mononuclear phagocytes : role of bone-forming cells** *J. Cell Biol.* 99, 1901-6
- 12 Udagawa N., Takahashi N., Akatsu T., Tanaka H., Sasaki T., Nishihara T., Koga T., Martin T.J. and Suda T. (1990) **Origin of the osteoclasts : mature monocytes and macrophages are capable of differentiating into osteoclasts under a suitable microenvironment prepared by bone marrow-derived stromal cells** *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 7260-4
- 13 Reinholt F.P., Hulthenby K., Oldberg A. and Heinegard D. (1990) **Osteopontin : a possible anchor of osteoclasts to bone** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 4473-5
- 14 Teitelbaum S.L., Stewart C.C. and Kahn A.J. (1979) **Rodent peritoneal macrophages as bone resorbing cell** *Calcif. Tissue Int.* 27, 255-61
- 15 Orr W., Varani J., Gondek M.D., Ward P.A. and Mundy G.R. (1979) **Chemotactic responses of tumor cells to product of resorbing bone** *Science* 203, 176-19
- 16 Eilon G. and Mundy G.R. (1978) **Direct resorption of bone by human breast cancer cells in vitro** *Nature* 276, 726-8
- 17 Kölliker A. (1873) **Die normale resorption des knochengewebes und ihre bedeutung für die entstehung der typischen knochenformen** *Vogel, Leipzig*
- 18 Sato M., Sardana M.K., Grasser W.A., Garsky V.M., Murray J.M. and Gould R.J. (1990) **Echistatin is a potent inhibitor of bone resorption in culture** *J. Cell Biol.* 111, 1713-23
- 19 Chambers T.J., Revell P.A., Fuller K. and Athanasou N.A. (1984) **Resorption of bone by isolated rabbit osteoclasts** *J. Cell Sci.* 66, 383-99
- 20 Miyauchi A., Alvarez J., Greenfield E.M., Teti A., Grano M., Colucci S., Zambonin-Zallone A., Ross F.P., Teitelbaum S.L. and Cheresch D. (1991) **Recognition of osteopontin and related peptides by an $\alpha_v\beta_3$ integrin stimulates immediate signals in osteoclasts** *J. Biol. Chem.* 266, 20369-74

- 21 Zambonin Zallone A., Teti A., Grano M., Rubinacci A., Abbadini M., Gaboli M. and Marchisio P.C. (1989) **Immunocytochemical distribution of extracellular matrix receptors in human osteoclasts. A β_3 integrin is colocalized with vinculin and talin in podosomes of osteoclastoma giant cells** *Exp. Cell. Res.* 182, 645-52
- 22 Davies J., Warwick J., Totty N., Philp R., Helfrich M. and Horton M. (1989) **The osteoclast functional antigen, implicated in the regulation of bone resorption, is biochemically related to the vitronectin receptor** *J. Cell. Biol.* 109, 1817-26
- 23 Oldberg A., Franzén A., Heinegard D., Peirschbacher M. and Ruoslahti E. (1988) **Identification of a bone sialoprotein receptor in osteosarcoma cells** *J. Biol. Chem.* 263, 19433-6
- 24 Helfrich M.H., Nesbitt S.A., Dorey E.L. and Horton M.A. (1992) **Rat osteoclasts adhere to a wide range of RGD (Arg-Gly-Asp) peptide-containing proteins, including the bone sialoproteins and fibronectin, via a beta 3 integrin** *J. Bone. Miner. Res.* 7, 335-43
- 25 Zambonin Zallone A., Teti A., Gaboli M. and Marchisio P.C. (1989) **Beta 3 subunit of vitronectin receptor is present in osteoclast adhesion structures and not in other monocyte-macrophage derived cells** *Connect Tissue Res.* 20, 143-9
- 26 Flores M., Norgard M., Heinegard D., Reinholt F.P. and Andersson G. (1992) **RGD-directed attachment of isolated rat osteoclasts to osteopontin, bone sialoprotein and fibronectin** *Exp. Cell Res.* 201, 526-530
- 27 Chenu C., Colucci S., Grano M., Zigrino P., Baratollo R., Zambonin G., Baldini N., Vergnaud P., Delmas P.D. and Zallone A.Z. (1994) **Osteocalcin induces chemotaxis secretion of matrix proteins, and calcium-mediated intracellular signalling in human osteoclast-like cells** *J. Cell Biol.* 127, 1149-58
- 28 Helfrich M.H., Nesbitt S.A., Lakkakorpi P.T., Barnes M.J., Bodary S.C., Shankar G., Mason W.T., Mendrick D.L., Väänänen H.K. and Horton M.A. (1996) **Beta 1 integrins and osteoclast function : involvement in collagen recognition and bone resorption** *Bone* 19, 317-28
- 29 Ek-Rylander B., Flores M., Wendel M., Heinegard D. and Andersson G. (1994) **Dephosphorylation of osteopontin and bone sialoprotein by osteoclastic tartrate-resistant acid phosphatase. Modulation of osteoclast adhesion in vitro** *J. Biol. Chem.* 269, 14853-6
- 30 Hill P.A., Docherty A.J., Bottomley K.M., O'Connell J.P., Morphy J.R., Reynolds J.J. and Meikle M.C. (1995) **Inhibition of bone resorption in vitro by selective inhibitors of gelatinase and collagenase** *Biochem. J.* 308, 167-75
- 31 Okada Y., Naka K., and Kawamura K. (1995) **Localization of matrix metalloproteinase 9 (92 kDa gelatinase/type IV collagenase = gelatinase B) in osteoclasts : implications for bone resorption** *Lab. Invest.* 72, 311-22
- 32 Zambonin Zallone A., Teti A. and Primavera M.V. (1982) **Isolated osteoclasts in primary culture : first observations on structure and survival in culture media** *Anat. Embryol.* 165, 405-13
- 33 Chambers T.J., Thomson B.M. and Fuller K. (1984) **Resorption of bone by isolated rabbit osteoclasts** *J. Cell Sci.* 66, 383-99
- 34 Väänänen H.K., Karhukorpi E.K., Sundquist K., Wallmark B., Roininen I., Hentunen T., Tuukkanen J. and Lakkakorpi P. (1990) **Evidence for the presence of a proton pump of the vacuolar H⁺-ATPase type in the ruffled borders of osteoclasts** *J. Cell Biol.* 111, 1305-11
- 35 Baron R., Neff L., Roy C. and al. (1986) **Evidence for a high and specific concentration of (Na⁺/K⁺) ATPase in the plasma membrane of the osteoclast** *Cell* 46, 311-20

- 36 Blair H.C., Teitelbaum S.L., Ghiselli R. and Bluck S. (1989) **Osteoclastic bone resorption by a polarized vacuolar proton pump** *Science* 245, 855-7
- 37 Paradiso A.M., Tsien R.Y. and Machen T.E. (1984) **Na⁺, H⁺ exchange in gastric glands as measured with a cytoplasmic-trapped, fluorescent pH indicator** *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81, 7436-40
- 38 Teti A., Blair H.C. and Teitelbaum S.L. (1989) **Cytoplasmic pH regulation and chloride/bicarbonate exchange in avian osteoclasts** *J. Clin. Invest.* 83, 227-33
- 39 Bekker P.J. and Gay C.V. (1990) **Characterization of Ca²⁺ ATPase in osteoclast plasma membrane** *J. Bone Miner. Res.* 5, 557-67
- 40 Baron R., Neff L., Brown W., Courtoy P.J., Louvard D. and Farquhar M.G. (1988) **Polarized secretion of lysosomal enzymes : co-distribution of cation-independent mannose-6-phosphate receptors and lysosomal enzymes along the osteoclast exocytic pathway** *J. Cell Biol.* 106, 1863-1872
- 41 Mostov K. and Werb Z. (1977) **Journey across the osteoclast** *Science* 276, 219-20
- 42 Baron R., Neff L., Louvard D. and Courtoy P.J. (1985) **Cell-mediated extracellular acidification and bone resorption : evidence for a low pH in resorbing lacunae and localization of a 100 kD lysosomal membrane protein on the osteoclast ruffled border** *J. Cell Biol.* 101, 2210-22
- 43 Delaisse J.M., Eeckhout Y. and Neff L. (1993) **Pro-collagenase (matrix metalloproteinase-1) is present in rodent osteoclasts and in the underlying bone-resorbing compartment** *J. Cell Sci.* 106, 1071-82
- 44 Young M.F., Kerr J.M., Ibaraki K., Heegaard A.M. and Gehron Robey P. (1992) **Structure, expression and regulation of the major noncollagenous matrix proteins of bone** *Clin. Orthop.* 275-94
- 45 Gehron Robey P., Fedarko N.S., Hefferan T.E., Bianco P., Vetter U.K., Grzesik W., Friedenstein A., Van der Pluijm G., Mintz K.P., and Young M.F. (1993) **Structure and molecular regulation of bone matrix proteins** *J. Bone Miner. Res.* 8, 483-7
- 46 Ali N.N., Boyde A. and Jones S.J. (1984) **Motility and resorption : osteoclastic activity in vitro** *Anat. Embryol.* 170, 51-5
- 47 Malgaroli A., Meldolesi J., Zambonin-Zallone A. and Teti A. (1989) **Control of cytosolic free calcium in rat and chicken osteoclasts. The role of extracellular calcium and calcitonin** *J. Biol. Chem.* 264, 14342-7
- 48 Miyauchi A., Hruska K.A., Greenfield E.M., Duncan R., Alvarez J., Barattolo R., Colucci S., Zambonin-Zallone A., Teitelbaum S.L. and Teti A. (1990) **Osteoclast cytosolic calcium, regulated by voltage-gated calcium channels and extracellular calcium, controls podosome assembly and bone resorption** *J. Cell Biol.* 111, 2543-52
- 49 Arnett T.R. and Dempster D.W. (1986) **Effect of pH on bone resorption by rat osteoclasts in vitro** *Endocrinology* 119, 119-24
- 50 Teti A., Blair H.C., Schlesinger P., Grano M., Zambonin-Zallone A., Kahn A.J., Teitelbaum S.L. and Hruska K.A. (1989) **Extracellular protons acidify osteoclasts, reduce cytosolic calcium and promote the expression of cell-matrix attachment structures** *J. Clin. Invest.* 84, 773-80
- 51 Chambers T.J. and Fuller K. (1985) **Bone cells predisposed bone surface to resorption by exposure of mineral to osteoclastic contact** *J. Cell Sci.* 76, 155-65
- 52 Peck W.A. and Woods W.L. (1988) **The cells of bone Osteoporosis : etiology, diagnosis and management**, Riggs B.L., Melton L.J., Raven press, New York 1-44
- 53 Rodan G.A. and Rodan S.B. (1983) **Expression of the osteoblastic phenotype** *Bone and mineral research*, Eds Peck W.A., Elsevier, Amsterdam 244-85

- 54 Lynch M.P., Stein J.L. and Lian J.B. (1995) **The influence of type I collagen on the development and maintenance of the osteoblast phenotype in primary and passaged rat calvarial osteoblasts : modification of expression of genes supporting cell growth, adhesion, and extracellular matrix mineralisation** *Exp. Cell Res.* 216, 35-45
- 55 Shi S., Kirk M. and Kahn A.J. (1996) **The role of type I collagen in the regulation of the osteoblast phenotype** *J. Bone Miner. Res.* 11, 1139-45
- 56 Rodan G.A. and Martin T.J. (1981) **Role of osteoblasts in hormonal control of bone resorption - A hypothesis** *Calcif. Tissue Int.* 33, 349-51
- 57 Miller S.C., Bowman B.M., Smith J.M. and Jee W.S.S. (1980) **Characterization of endosteal bone-lining cells from fatty marrow bone sites in adult beagles** *Anat. Rec.* 198, 163-73
- 58 Marie P.J. (1995) **Human osteoblastic cells : relationship with bone formation** *Calcif. Tissue Int.* 56, 13-6
- 59 Owen M. (1985) **Lineage of osteogenic cells and their relationship to the stromal system** *Bone and Mineral Research, Peck W.A. Eds, Elsevier, Amsterdam* 1-23
- 60 Machwate M., Julliene A., Moukhtar M. and Marie P.J. (1995) **Temporal variation of c-fos proto-oncogene expression during osteoblast differentiation and osteogenesis in developing bone** *J. Cell Biochem.* 57, 62-70
- 61 Stein G.S., Lian J.B. and Owen T.A. (1990) **Relationship of cell growth to the regulation of tissue-specific gene expression during osteoblast differentiation** *FASEB J.* 4, 3111-22
- 62 Grzesik W.J. and Gehron Robey P. (1994) **Bone matrix RGD glycoproteins : immunolocalization and interaction with human primary osteoblastic bone cells *in vitro*** *J. Bone Miner. Res.* 9, 487-96
- 63 Godet D. and Marie P.J. (1995) **Effects of the tripeptide glycyl-L-histidyl-L-lysine copper complex on osteoblastic cell spreading, attachment and phenotype** *Cell Mol. Biol.* 41, 8, 1081-91
- 64 Leblond C.P. (1989) **Synthesis and secretion of collagen by cells of connective tissue** *Bone Dentin Anat. Rec.* 224, 123-38
- 65 Boskey A.L. (1989) **Noncollagenous matrix proteins and their role in mineralization** *Bone Miner.* 6, 111-23
- 66 Gehron Robey P. (1989) **The biochemistry of bone** *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* 18, 859-902
- 67 Aarden E.M., Wassenaar A.M., Alblas M.J. and Nijweide P.J. (1996) **Immunocytochemical demonstration of extracellular matrix proteins in isolated osteocytes** *Histochem. Cell Biol.* 106, 495-501
- 68 Sodek J. and Berkman F.A. (1987) **Bone cell cultures** *Methods in Enzymol.* 145, 303-24
- 69 Harter L.V., Hruska K.A. and Duncan R.L. (1995) **Human osteoblast-like cells respond to mechanical strain with increased bone matrix protein production independent of hormonal regulation** *Endocrinology* 136, 528-35
- 70 Izbicka E., Yoneda T., Takaoka Y., Horn D and Williams P. (1996) **Identification of a novel bone/calcium metabolism-regulating factor in porcine pancreas** *J. Biol. Chem.* 271, 23230-4
- 71 Cuq P., Marcelli C., Cousse H. and Bali J.P. (1995) **Effects of an hydrosoluble fraction from bovine bone (Ossopan) on murine osteoblasts in culture** *C.R. seances Soc. Biol. Fil.* 189, 303-12
- 72 Bonar L.C., Grynepas M.D. and Ronerts J.E. (1985) **Physical and chemical characterization of the development and maturation of bone mineral** *The chemistry and biology of mineralized tissues, Butler W.T., Birmingham, Ebsco Media*, 226-33

- 73 Hunter G.K. (1991) **Bone metabolism and mineralization** Eds Hall B.K., CRC, Boca Raton, FL pp.225-47
- 74 Glimcher M.J. (1989) **Mechanism of calcification : role of collagen fibrils and collagen-phosphoprotein complexes *in vitro* and *in vivo*** *Anat. Rec.* 224, 139-53
- 75 Romberg R.W., Werness P.G., Riggs B.L. and Mann K.G. (1986) **Inhibition of hydroxyapatite crystal growth by bone-specific and other calcium-binding proteins** *Biochemistry* 25, 1176-80
- 76 Hunter G.K. and Goldberg H.A. (1993) **Nucleation of hydroxyapatite by bone sialoprotein** *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 8562-5
- 77 Becker G.L. (1977) **Calcification mechanisms : role for cells and mineral** *J. Oral Pathol.* 6, 307-15
- 78 Anderson H.C., Matsuzawa T., Sajdera S.W. and Ali S.Y. (1970) **Membranous particles in calcifying cartilage matrix** *Trans. NY Acad. Sci.* 32, 619-30
- 79 Bernard G. and Marvaso V. (1981) **Matrix vesicles as an assay for primary tissue calcification *in vivo* and *in vitro*** *Matrix vesicles Ascenzi A., Bonucci E. and de Bernard B., Eds Wichtig Editore, Milan* 1-11
- 80 Arsenault A.L. (1991) **Image analysis of collagen-associated mineral distribution in cryogenically prepared turkey leg tendons** *Calcif. Tissue Int.* 48, 56-62
- 81 Arsenault A.L., Frankland B.W. and Ottensmeyer F.P. (1991) **Vectorial sequence of mineralization in the turkey leg tendon determined by electron microscopic imaging** *Calcif. Tissue Int.* 48, 46-52
- 82 Stanford C.M., Jacobson P.A., Eanes E.D., Lembke L.A. and Midura R.J. (1995) **Rapidly forming apatitic mineral in an osteoblastic cell line (UMR 106-01 BSP)** *J. Biol. Chem.* 270, 9420-8
- 83 Fisher L.W. and Termine J.D. (1985) **Non collagenous proteins influencing the local mechanisms of calcification** *Clin. Orthop. Rel. Res.* 200, 362-85
- 84 Fallon M.D., Whyte M.P. and Teitelbaum S.L. (1980) **Stereospecific inhibition of alkaline-phosphatase by L-tetramisole prevents *in vitro* cartilage calcification** *Lab. Invest.* 43, 489-94
- 85 Krieger N.S. (1991) **Evidence for sodium-calcium exchange in rodent osteoblasts** *Ann. NY Acad. Sci.* 639, 660-2
- 86 Prockop D.J., Kivirikko K.I., Tudermann L. and Guzman N.A. (1979) **The biosynthesis of collagen and its disorders** *N. Engl. J. Med.* 301, 13-23
- 87 Kühn K., Wiestner M., Krieg T. and Müller P.K. (1982) **Structure and function of the amino terminal propeptide of type I and III collagen** *Connect. Tissue Res.* 10, 43-50
- 88 Iida-Klein A., Yee D.C. and Brandli D.W. (1992) **Effects of calcitonin on 3',5'-cyclic adenosine monophosphate and calcium second messenger generation and osteoblast function in UMR 106-06 osteoblast-like cells** *Endocrinology* 130, 381-8
- 89 Dedhar S., Ruoslahti E. and Pierschbacher M.D. (1987) **A cell surface receptor complex for collagen type I recognizes the Arg-Gly-Asp sequence** *J. Cell Biol.* 104, 585-93
- 90 Kuwata F., Maeno M. and Yao K.L. (1987) **Characterization of a monoclonal antibody recognizing small collagenous proteins in fetal calf bone** *Collagen Relat. Res.* 7, 39-55
- 91 Wight T.N., Heinegard D.K. and Hascall V.C. **Proteoglycans : structure and function** *Cell Biology of extracellular matrix, Second edition, Plenum press, New York* 45-78
- 92 Kjellén L. and Lindahl (1991) **Proteoglycans : structures and interactions** *Annu. Rev. Biochem.* 60, 443-75
- 93 Fisher L.W. (1985) **The nature of the proteoglycans of bone** *The Chemistry and Biology of Mineralized Tissues, W.T. Butler Ed., EBSCO Media, Birmingham, Alabama* 188-96

- 94 Fisher L.W., Hawkins G.R., Tuross N. and Termine J.D. (1987) **Purification and partial characterization of small proteoglycans I and II, bone sialoproteins I and II, and osteonectin from the mineral compartment of developing human bone** *J. Biol. Chem.* 262, 9702-8
- 95 Fisher L.W., Termine J.D., Dejter S.W., Whitson S.W., Yanagishita M., Kimura J.H., Hascall V.C., Kleinman H.K., Hassell J.R. and Nilsson B. (1983) **Proteoglycans of developing bone** *J. Biol. Chem.* 258, 6588-94
- 96 Fisher L.W., Termine J.D., and Young M.F. (1989) **Deduced protein sequence of bone small proteoglycan I (biglycan) shows homology with proteoglycan II (decorin) and several nonconnective tissue proteins in a variety of species** *J. Biol. Chem.* 264, 4571-6
- 97 Bianco P., Fisher L.W. and Young M.F. (1990) **Expression and localization of the two small proteoglycans biglycan and decorin in developing human skeletal and non-skeletal tissues** *J. Histochem. Cytochem.* 38, 1549-63
- 98 Fisher L.W., Termine J.D., Dejter S.W. Jr., Whitson S.W., Yanagishita M., Kimura J.H., Hascall V.C., Kleinman H.K., Hassell J.R. and Nilsson B. (1983) **Proteoglycans of developing bone** *J. Biol. Chem.* 258, 6588-94
- 99 Vogel K.G., Paulsson M. and Heinegard D. (1984) **Specific inhibition of type I and II collagen fibrillogenesis by the small proteoglycan of tendon** *Biochem. J.* 223, 587-97
- 100 Gehron Robey P., Bianco P. and Termine J.D. (1992) **The cellular biology and molecular biochemistry of bone formation Disorders of bone and mineral metabolism, Eds Coe F.L. and Favus M.J., Raven Press** 241-63
- 101 Nagata T., Goldberg H.A., Zhang Q., Domenicucci C. and Sodek J. (1991) **Biosynthesis of bone proteins by fetal porcine calvariae in vitro. Rapid association of sulfated sialoproteins (secreted phosphoprotein-I and bone sialoprotein) and chondroitin sulfate proteoglycan (CS-PG III) with bone mineral** *Matrix* 11, 86-100
- 102 Heinegard D. and Oldberg. A. (1989) **Structure and biology of cartilage and bone matrix noncollagenous macromolecules** *FASEB J.* 3, 2042-51
- 103 Hedbom E. and Heinegard D. (1989) **Interaction of a 59 kDa connective tissue matrix protein with collagen I and II** *J. Biol. Chem.* 264, 6898-905
- 104 Hashimoto Y., Lester G.E., Caterson B. and Yamauchi M. (1995) **EDTA-insoluble, calcium-binding proteoglycan in bovine bone** *Cacif. Tissue Int.* 56, 398-402
- 105 Andres J.L., Stanley K., Cheifetz S. and Massagué J. (1989) **Membrane-anchor and soluble forms of betaglycan, a polymorphic proteoglycan that binds transforming growth factor β** *J. Cell. Biol.* 109, 3137-45
- 106 Kinne R.W. and Fisher L.W. (1987) **Keratan sulfate proteoglycan in rabbit compact bone is bone sialoprotein II** *J. Biol. Chem.* 262, 10206-11
- 107 Gallop P.M., Lian J.B. and Hauschka P.V. (1980) **Carboxylated calcium binding proteins in vitamin K N.** *Engl. J. Med.* 26, 1460-6
- 108 Stenflo J., Fernlund P., Egan W. and Roepstorff P. (1974) **Vitamin K dependent modifications of glutamic acid residues in prothrombin** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71, 2730-3
- 109 Lian J.B., Hauschka P.V. and Gallop P.M. (1978) **Properties and biosynthesis of a vitamin K-dependent calcium binding protein in bone** *Fed. Proc.* 37, 2615-20
- 110 Hauschka P.V., Lian J.B., Cole D.E.C. and Gundberg C.M. (1989) **Osteocalcin and matrix Gla protein : vitamin K-dependent proteins in bone** *Physiol. Rev.* 69, 990-1047
- 111 Price P.A., Otsuka A.S., Poser J.W., Kristaponis J. and Raman N. (1976) **Characterization of a gamma-carboxyglutamic acid containing protein from bone** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73, 1447-51

- 112 Atkinson R.A., Evans J.S., Hauschka P.V., Levine B.A., Meats R., Triffitt J.T., Virci A.S. and Williams R.J.P. (1995) **Conformational studies of osteocalcin in solution** *Eur. J. Biochem.* 232, 515-21
- 113 Prigodich R.V., O'Connor T. and Coleman J.E. (1985) ^1H , ^{113}Cd and ^{31}P NMR of osteocalcin (bovine γ carboxyglutamic acid containing protein) *Biochemistry* 24, 6291-8
- 114 Isbell D.T., Du S., Schoering A.G., Colombo G. and Shelling J.G. (1993) **Metal ion binding to dog osteocalcin studied by ^1H NMR Spectroscopy** *Biochemistry* 32, 11352-62
- 115 Hauschka P.V. and Carr S.A. (1982) **Calcium-dependant α -helical structure in osteocalcin** *Biochemistry* 21, 2538-47
- 116 Hauschka P.V. and Wians F.H. (1989) **Osteocalcin-hydroxyapatite interaction in the extracellular organic matrix of bone** *Anat. Rec.* 224, 180-8
- 117 Poser J.W. and Price P.A. (1979) **A method for the decarboxylation of gamma carboxyglutamic acid in proteins** *J. Biol. Chem.* 254, 431-6
- 118 Hauschka P.V. (1985) **Osteocalcin and its functional domains** *The Chemistry and Biology of Mineralized Tissues*, W.T. Butler Ed., EBSCO Media, Birmingham, Alabama p. 149
- 119 Nishimoto S.K. and Price P.A. (1979) **Proof that the gamma-carboxyglutamic acid-containing bone protein is synthesised in calf bone** *J. Biol. Chem.* 254, 437-41
- 120 Puchacz E., Lian J.B., Stein G.S., Wozney J., Huebner K. and Croce C. (1989) **The chromosomal localization of human osteocalcin gene** *Endocrinology* 124, 2648-50
- 121 Pan L.C. and Price P.A. (1985) **The propeptide of rat bone gamma-carboxyglutamic acid protein shares homology with other vitamin K-dependent protein precursors** *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82, 6109-14
- 122 Stein G.S. and Lian J.B. (1993) **Molecular mechanisms mediating proliferation/differentiation interrelationships during progressive development of the osteoblast phenotype** *Endocrinol. Rev.* 14, 424-42
- 123 Price P.A. and Baukol S.A. (1980) **1,25-dihydroxyvitamin D₃ increases synthesis of the vitamin K-dependent bone protein by osteosarcoma cells** *J. Biol. Chem.* 255, 11660-3
- 124 Nishimoto S.K. and Price P.A. (1980) **Secretion of the vitamin K-dependent protein of bone by rat osteosarcoma cells. Evidence for an intracellular precursor** *J. Biol. Chem.* 255, 6579-83
- 125 Price P.A. and Baukol S.A. (1980) **1,25-dihydroxyvitamin D₃ increases synthesis of the vitamin K-dependent bone protein by osteosarcoma cells** *J. Biol. Chem.* 255, 11660-3
- 126 Norman A.W. and Wecksler W.R. (1978) **Vitamin D receptors and biologic responses** *Receptors and hormone action*, Eds O'Malley B.W. and Birnbaumer L., Academic press, New York, Vol.2 533-71
- 127 Lian J.B., Coutts M. and Canalis E. (1985) **Studies of hormonal regulation of osteocalcin synthesis in cultured fetal rat calvariae** *J. Biol. Chem.* 260, 8706-10
- 128 Price P.A., Williamson M.K. and Lothringer J.W. (1981) **Origin of the vitamin K-dependent bone protein found in plasma and its clearance by kidney and bone** *J. Biol. Chem.* 256, 12760-6
- 129 Price P.A., Epstein D.J., Lothringer J.W., Nishimoto S.K., Poser J.W. and Williamson M.K. (1979) **Vitamin K metabolism and vitamin K-dependent protein of bone** *Ed Suttie J.W., University park press, Baltimore* 219-26
- 130 Price P.A., Lothringer J.W., Baukol S.A. and Reddi A.H. (1981) **Developmental appearance of the vitamin K-dependent protein of bone during calcification** *J. Biol. Chem.* 256, 3781-4

- 131 Hauschka P.V., Frenkel J., DeMuth R. and Gundberg L.M. (1983) **Presence of osteocalcin and related higher molecular weight 4-carboxyglutamic acid-containing proteins in developing bone** *J. Biol. Chem.* 258, 176-82
- 132 Mundy G.R. and Poser J.W. (1983) **Chemotactic activity of the gamma-carboxyglutamic acid containing protein in bone** *Calcif. Tissue Int.* 35, 164-8
- 133 Veis A. (1985) **The Chemistry and Biology of Mineralized Tissues** W.T. Butler Ed., EBSCO Media, Birmingham, Alabama 170-176
- 134 Gendreau M.A., Krishnaschwamy S. and Mann K.G. (1989) **The interaction of bone-GLA (osteocalcin) protein with phospholipides vesicules** *J. Biol. Chem.* 264, 6972-8
- 135 Malone J.D., Teitelbaum S.L., Griffin G.L., Senior R.M. and Kahn A.J. (1982) **Recruitment of osteoclast precursors by purified bone matrix constituents** *J. Cell. Biol.* 92, 227-30
- 136 Glowacki J., Rey C., Glimcher M.J., Cox K.A. and Lian J. (1991) **A role for osteocalcin in osteoclast differentiation** *J. Cell. Biochem.* 45, 292-302
- 137 Serre C.M., Price P. and Delmas P.D. (1995) **Degradation of subcutaneous implants of bone particles from normal and warfarin-treated rats** *J. Bone Miner. Res.* 8, 1158-68
- 138 Price P.A. (1989) **Gla-containing proteins of bone** *Connect. Tissue Res.* 21, 51-7
- 139 Price P.A., Urist M.R. and Otawara Y. (1983) **Matrix Gla protein, a new gamma-carboxyglutamic acid-containing protein which is associated with the organic matrix of bone** *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 117, 765-71
- 140 Price P.A. and Williamson M.K. (1985) **Primary structure of bovine matrix Gla protein, a new vitamin K-dependent bone protein** *J. Biol. Chem.* 260, 14971-5
- 141 Price P.A., Fraser J.D. and Metz-Virca G. (1987) **Molecular cloning of matrix Gla-protein : implications for substrate recognition by the vitamin K-dependent gamma-carboxylase** *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84, 8335-9
- 142 Kiefer M.C., Bauer D.M., Young D., Hermsen K.M., Masiarz F.R. and Barr P.J. (1988) **The cDNA and derived amino acid sequences for human and bovine matrix Gla protein** *Nucleic Acids Res.* 16, 5213
- 143 Otawara Y. and Price P.A. (1986) **Developmental appearance of matrix Gal protein during calcification in the rat** *J. Biol. Chem.* 261, 10828-32
- 144 Price P.A., Williamson M.K. and Lothringer J.W. (1981) **Effets of warfarin on bone. Studies on the vitamin K-dependent protein of rat bone** *J. Biol. Chem.* 256, 12754-9
- 145 Fraser J.D. and Price P.A. (1988) **Lung, heart, and kidney express high levels of mRNA for the vitamin K-dependent matrix Gla-protein. Implications for the possible functions of matrix Gla-protein and for the possible distribution of the gamma-carboxylase** *J. Biol. Chem.* 263, 11033-6
- 146 Maillard C., Berruyer M., Serre C.M., Dechavane M. and Delmas P.D. (1992) **Protein S, a vitamin K-dependent protein, is a bone matrix component synthesized and secreted by osteoblasts** *Endocrinology* 130, 1599-604
- 147 Franzén A. and Heinegard D. (1985) **Isolation and characterization of two sialoproteins present only in bone calcified matrix** *Biochem. J.* 232, 715-24
- 148 Andrews A.T., Herring G.M. and Kent P.W. (1969) **The periodate oxidation of bovine bone sialoprotein, and some observations on its structure** *Biochem. J.* 111, 621-7
- 149 Herring G.M. and Kent P.W. (1963) **Some studies on mucosubstances of bovine cortical bone** *Biochem. J.* 89, 405-14
- 150 D'Souza S.E., Ginsberg M.H. and Plow E.F. (1991) **Arginyl-glycyl-aspartic acid (RGD) : a cell adhesion motif** *TIBS*, 16, 146-50

- 151 Cohen-Sohal L., Lian J.B., Kossiva D. and Glimcher M.J. (1979) **Identification of organic phosphorus covalently bound to collagen and non-collagenous proteins of chicken bone matrix** *Biochem J.* 177, 81-98
- 152 Gorski J.P. and Shimizu K. (1988) **Isolation of new phosphorylated glycoprotein from mineralized phase of bone that exhibits limited homology to adhesive protein osteopontin** *J. Biol. Chem.* 263, 15938-45
- 153 Uchiyama A., Suzuki M., Lefteriou B. and Glimcher M.J. (1986) **Isolation and chemical characterization of the phosphoproteins of chicken bone matrix : heterogeneity in molecular weight and composition** *Biochemistry* 25, 7572-83
- 154 MacKee M.D., Nanci A., Landis W.J., Gotoh Y., Gerstenfeld L.C. and Glimcher M.J. (1990) **Developmental appearance and ultrastructural immunolocalization of a major 66 kDa phosphoprotein in embryonic and post-natal chicken bone** *Anat. Rec.* 228, 77-92
- 155 Fisher L.W., Whiston S.W., Avioli L.V. and Termine J.D. (1983) **Matrix sialoprotein of developing bone** *J. Biol. Chem.* 258, 12723-7
- 156 Oldberg A., Franzén A. and Heinegard D. (1988) **The primary structure of a cell-binding bone sialoprotein** *J. Biol. Chem.* 263, 19430-2
- 157 Zhang Q., Domenicucci C., Goldberg H.A., Wrana J.L. and Sodek J. (1990) **Characterization of fetal porcine bone sialoproteins, secreted phosphoprotein I (SPPI, osteopontin), bone sialoprotein, and a 23-kDa glycoprotein. Demonstration that the 23-kDa glycoprotein is derived from the carboxyl terminus of SPPI** *J. Biol. Chem.* 265, 7583-9
- 158 Escarot-Charrier B., Bouchard F. and Delloye C. (1989) **Bone sialoprotein II synthesized by cultured osteoblasts contains tyrosine sulfate** *J. Biol. Chem.* 264, 20049-53
- 159 Fisher L.W., MacBride O.W., Termine J.D. and Young M.F. (1990) **Human bone sialoprotein : deduced protein sequence and chromosomal location** *J. Biol. Chem.* 265, 2347-51
- 160 Midura R.J. and Hascall V.C. (1996) **Bone sialoprotein, a mucin in disguise?** *Glycobiology* 6, 677-81
- 161 Midura R.J., McQuillan D.J., Kent J.B., Fisher L.W. and Hascall (1990) **A rat osteogenic cell line (UMR 106-01) synthesizes a highly sulfated form of bone sialoprotein** *J. Biol. Chem.* 265, 5285-91
- 162 Hunter G.K. and Goldberg H.A. (1994) **Modulation of crystal formation by bone phosphoproteins : role for glutamic acid-rich sequences in the nucleation of hydroxyapatite by bone sialoprotein** *Biochem. J.* 302, 175-9
- 163 Somerman M.J., Sauk J.J. and Foster R.A. (1991) **Cell attachment activity of cementum : bone sialoprotein II identified in cementum** *J. Periodont. Res.* 26, 10-6
- 164 Chen J., Shapiro H.S., Wrana J.L., Reimers S., Heersche J.N. and Sodek J. (1991) **Localization of bone sialoprotein (BSP) expression to sites of mineralized tissue formation in fetal rat tissues by in situ hybridization** *Matrix* 11, 133
- 165 Sodek J., Chen J., Kasugai S., Nagata T., Zhang Q., McKee M.D. and Nanci A. (1992) **Elucidating the functions of bone sialoprotein and osteopontin in bone formation** *Chemistry and Biology of Mineralized Tissues, Price HSAp Eds., Elsevier Science Publishers, New York* 297-306
- 166 Bianco P., Fisher L.W., Young M.F., Termine J.D. and Gehron Robey P. (1991) **Expression of bone sialoprotein in developing human tissues** *Calcif. Tissue Int.* 49, 421-6
- 167 Chen J., MacKee M.D., Nanci A. and Sodek J. (1994) **Bone sialoprotein mRNA expression and ultrastructural localization in fetal porcine calvarial bone : comparisons with osteopontin** *Histochem. J.* 26, 67-78

- 168 Zhou H.Y., Takita H., Fujisawa R., Mizuno M. and Kuboki Y. (1995) **Stimulation by bone sialoprotein of calcification in osteoblast-like MC3T3-E1 cells** *Calcif. Tissue Int.* 56, 403-7
- 169 Bianco P., Riminucci M., Bonucci E., Termine J.D. and Gehron Robey P. (1993) **Bone sialoprotein secretion and osteoblast differentiation : relationship to bromodeoxyuridine incorporation, alkaline phosphatase and matrix deposition** *J. Histochem. Cytochem.* 41, 183-91
- 170 Masi L. (1995) **Biosynthesis of bone sialoprotein by a human osteoclast-like cell line (FLG 29.1)** *J. Bone Miner. Res.* 10, 187-96
- 171 Hultenby K., Reinholt F.P., Norgard M., Oldberg A., Wendel M. and Heinegard D. (1994) **Distribution and synthesis of bone sialoprotein in metaphyseal bone of young rats show a distinctly different pattern from that of osteopontin** *Eur. J. Cell Biol.* 63, 230-9
- 172 Bianco P., Riminucci M., Silvestrini G., Bonucci E., Termine J.D., Fisher L.W. and Gehron Robey P. (1993) **Localization of bone sialoprotein (BSP) to Golgi and post-Golgi secretory structures in osteoblasts and to discrete sites in early bone matrix** *J. Histochem. Cytochem.* 41, 193-203
- 173 Kasugai S., Todescan R. Jr., Nagata T., Yao K.L., Butler W.T. and Sodek J. (1991) **Expression of bone matrix proteins associated with mineralized tissue formation by adult rat bone marrow cells in vitro : inductive effects of dexamethasone on the osteoblastic phenotype** *J. Cell Physiol.* 147, 111-20
- 174 Oldberg A., Jirskog-Hed B., Axelsson S. and Heinegard D. (1989) **Regulation of bone sialoprotein mRNA by steroid hormones** *J. Cell Biol.* 109, 3183-6
- 175 Yang R. and Gerstenfeld L.C. (1996) **Signal transduction pathways mediating parathyroid hormone stimulation of bone sialoprotein gene expression in osteoblasts** *J. Biol. Chem.* 271, 29839-46
- 176 Mintz K.P., Fisher L.W., Grzesik W.J., Hascall V.C. and Midura R.J. (1994) **Chlorate-induced inhibition of tyrosine sulfation on bone sialoprotein synthesised by a rat osteoblast-like cell line (UMR-106-01 BSP)** *J. Biol. Chem.* 269, 4845-52
- 177 Mintz K.P., Grzesik W.J., Midura R.J., Gehron Robey P., Termine J.D. and Fisher L.W. (1993) **Purification and fragmentation of non denatured bone sialoprotein : evidence for a cryptic, RGD-resistant cell attachment domain** *J. Bone Miner. Res.* 8, 985-95
- 178 Ross F.P., Chappel J., Alvarez I., Sander D., Butler W.T., Farach-Carson M.C., Mintz K.A., Gehron Robey P., Teitelbaum S.L. and Cheresch D.A. (1993) **Interactions between the bone matrix proteins osteopontin and bone sialoprotein and the osteoclast integrin $\alpha_v\beta_3$ potentiate bone resorption** *J. Biol. Chem.* 268, 9901-7
- 179 Hunter G.K. and Goldberg H.A. (1994) **Modulation of crystal formation by bone phosphoproteins : role of glutamic acid-rich sequences in the nucleation of hydroxyapatite by bone sialoprotein** *Biochem. J.* 302, 175-9
- 180 Nagata T., Bellows C.G., Kasugai S., Butler W.T. and Sodek J. (1991) **Biosynthesis of bone proteins [SPP-1 (secreted phosphoprotein-1, osteopontin), BSP (bone sialoprotein) and SPARC (osteonectin)] in association with mineralized-tissue formation by fetal-rat calvarial cells in culture** *Biochem. J.* 274, 513-20
- 181 Fujisawa R. and Kuboki Y. (1992) **Affinity of bone sialoprotein and several other bone and dentin acidic proteins to collagen fibrils** *Calcif. Tissue Int.* 51, 438-42
- 182 Ryden C., Yacoub A.I., Maxe I., Heinegard D., Oldberg A., Franzen A., Ljungh A. and Rubin K. (1989) **Specific binding of bone sialoprotein to Staphylococcus aureus isolated from patients with osteomyelitis** *Eur. J. Biochem.* 184, 331-6
- 183 Denhardt D.T. and Guo X. (1993) **Osteopontin : a protein with diverse functions** *FASEB J.* 7, 1475-82

- 184 Kerr J.M., Fisher L.W., Termine J.D. and Young M.F. (1991) The cDNA cloning and RNA distribution of bovine osteopontin *Gene* 108, 237-43
- 185 Oldberg A., Franzén A. and Heinegard D. (1986) Cloning and sequencing analysis of rat bone sialoprotein (osteopontin) cDNA reveals an arg-lys-asp cell-binding sequence *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 8819-23
- 186 Smith J.H. and Denhardt D.T. (1987) Molecular cloning of a tumor promoter-inducible mRNA found in JB6 mouse epidermal cells : induction is stable at high, but not at low, cell densities *J. Cell Biochem.* 34, 13-22
- 187 Wrana J.L., Zhang Q. and Sodek J. (1989) Full length sequence of porcine secreted phosphoprotein-I (SPP-I, osteopontin) *Nucleic Acids Res.* 17, 10119
- 188 Gotoh Y., Pierschbacher M.D., Grzeiak J.J., Gerstenfeld L. and Glimcher M.J. (1990) Comparison of two phosphoproteins in chicken bone and their similarities to the mammalian bone proteins, osteopontin and bone sialoprotein II *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 173, 471-9
- 189 Castagnola P., Bet P., Quarto R., Gennari M. and Cancedda R. (1991) cDNA cloning and gene expression of chicken osteopontin *J. Biol. Chem.* 266, 270-4
- 190 Kubota T., Zhang Q., Wrana J.L., Ber R., Aubin J.E., Butler W.T. and Sodek J. (1989) Multiple forms of SppI (secreted phosphoprotein, osteopontin) synthesized by normal and transformed rat bone cell populations : regulation by TGF- β *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 162, 1453-9
- 191 Singh K., DeVouge M.W. and Mukherjee B.B. (1990) Physiological properties and differential glycosylation of phosphorylated and nonphosphorylated forms of osteopontin secreted by normal rat kidney cells *J. Biol. Chem.* 265, 18696-701
- 192 Young M.F., Fisher L.W., McBride O.W. and Termine J.D. Chromosomal localization of bone matrix PGI (biglycan), PGII (decorin), osteopontin and bone sialoprotein in the human genome *J. Bone Miner. Res.* 4, S380
- 193 Prince C.W. (1989) Secondary structure predictions for rat osteopontin *Connect. Tissue Res.* 21, 15-20
- 194 Mark M.P., Butler W.T., Prince C.W., Finkelman R.D. and Ruch J.V. (1988) Developmental expression of 44 kDa bone phosphoprotein (osteopontin) and bone gamma-carboxyglutamic acid (Gla)-containing protein (osteocalcin) in calcifying tissues of rat *Differentiation* 37, 123-8
- 195 Dodds R.A., Connor J.R., James I.E., Rykaczewski E.L., Appelbaum E., Dul E. and Gowen M. (1995) Human osteoclasts, not osteoblasts, deposit osteopontin onto resorption surfaces : an in vitro and ex vivo study of remodeling bone *J. Bone Miner.* 10, 1666-80
- 196 Tezuka K.I., Sato T., Kamioka H., Nijweide P.J., Tanaka K., Matsuo T., Ohta M., Kurihara N., Hakeda Y. and Kumegawa M. (1992) Identification of osteopontin in isolated rabbit osteoclasts *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 186, 911-7
- 197 Merry K., Dodds R., Littlewood A. and Gowen M. (1993) Expression of osteopontin mRNA by osteoclasts and osteoblasts in modelling adult human bone *J. Cell Sci.* 104, 1013-20
- 198 Nomura S., Wills A.J., Edwards D.R., Heath J.K. and Hogan B.L.M. (1988) Developmental expression of 2ar (osteopontin) and SPARC (osteonectin) RNA as revealed by in situ hybridization *J. Cell Biol.* 106, 441-50
- 199 Chambers A.F., Behrend E.L., Wilson S.M. and Denhardt D.T. (1992) Induction of osteopontin (OPN; secreted phosphoprotein) in metastatic, Ras-transformed NIH 3T3 cells *Anticancer Res.* 12, 43-8

- 200 Senger D.R., Perruzzi C.A. and Papadoulos A. (1989) Elevated expression of secreted phosphoprotein I (osteopontin, 2ar) as a consequence of neoplastic transformation *Anticancer Res.* 9, 1291-300
- 201 Shiraga H., Min W. and VanDusen W.J. (1992) Inhibition of calcium oxalate crystal growth *in vitro* by uropontin : another member of the aspartic acid-rich protein superfamily *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 426-30
- 202 Yoon K., Buenaga R. and Rodan G.A. (1987) Tissue specificity and developmental expression of rat osteopontin *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 148, 1129-36
- 203 Jin C.H., Miyaura C. and Ishimi Y. (1990) Interleukin I regulates the expression of osteopontin mRNA by osteoblasts *Mol. Cell Endocrinol.* 74, 221-8
- 204 Kasugai S., Zhang Q. and Overall C.M. (1991) Differential regulation of the 55 and 44 kDa forms of secreted phosphoprotein 1 (SPP-1, osteopontin) in normal and transformed rat bone cells by osteotropic hormones, growth factors and a tumor promoter *Bone Miner.* 13, 235-50
- 205 Sorensen E.S., Hojrup P. and Petersen T.E. (1995) Posttranslational modifications of bovine osteopontin : identification of twenty-eight phosphorylation and three O-glycosylation sites *Protein Sci.* 4, 2040-9
- 206 Hunter G.K., Kyle C.L. and Goldberg H.A. (1994) Modulation of crystal formation by bone phosphoproteins : structural specificity of the osteopontin -mediated inhibition of hydroxyapatite formation *Biochem. J.* 300, 723-8
- 207 Sodek J., Chen J., Kasugai S., Nagata T., Zhang Q., McKee M.D. and Nanci A. (1992) Elucidating the functions of bone sialoprotein and osteopontin in bone formation *Chemistry and Biology of Mineralized Tissues, Price H&S&P Eds., Elsevier Science Publishers, New York* 297-306
- 208 Miyauchi A., Alvarez J., Greenfield E.M., Teti A., Grano M., Colucci S., Zambonin-Zallone A., Ross F.P., Teitelbaum S.L., Cheresch D. and Hruska K.A. (1993) Binding of osteopontin to the osteoclast integrin $\alpha_v\beta_3$ *Osteoporosis Int.* 1, 132-5
- 209 Smith L.L., Cheung H-K., Ling L.E., Chen J., Sheppard D., Pytela R. and Giachelli C.M. (1996) Osteopontin N-terminal domain contains a cryptic adhesive sequence recognized by $\alpha_9\beta_1$ integrin *J. Biol. Chem.* 271, 28485-91
- 210 Hultenby K., Reinholt F.P., Oldberg A. and Heinegard D. (1991) Ultrastructural immunolocalization of osteopontin in metaphyseal and cortical bone *Matrix* 11, 206-13
- 211 Ritter N.M., Farach-Carson M.C. and Butler W.T. (1992) Evidence for the formation of a complex between osteopontin and osteocalcin *J. Bone Miner.* 7, 877-85
- 212 Giachelli C.M., Bae N. and Almeida M. (1993) Osteopontin is elevated during neointima formation in rat arteries and is novel component of human atherosclerotic plaques *J. Clin. Invest.* 92, 1686-96
- 213 Hirota S., Ito A. and Nagoshi J. (1995) Expression of bone matrix protein messenger ribonucleic acids in human breast cancers *Lab. Invest.* 72, 64-9
- 214 Bellahcène A. and Castronovo V. (1995) Increased expression of osteonectin and osteopontin, two bone matrix proteins, in human breast cancer *Am. J. Pathol.* 146, 95-100
- 215 Bellahcène A., Merville M-P. and Castronovo V. (1994) Expression of bone sialoprotein, a bone matrix protein, in human breast cancer *Cancer Res.* 54, 2823-6
- 216 Behrend E.I., Craig A.M. and Wilson S.M. (1994) Reduced malignancy of ras-transformed NIH 3T3 cells expressing antisense osteopontin RNA *Cancer Res.* 54, 832-7

- 217 Gorski J.P., Griffin D., Dudley G., Stanford C., Thomas R., Huang C., Lai E., Karr B. and Solursh M. (1990) **Bone acidic glycoprotein-75 is major synthetic product of osteoblastic cells and localized as 75- and/or 50-kDa forms in mineralized phases of bone and growth plate and in serum** *J. Biol. Chem.* 265, 14956-63
- 218 Chen J., Bal B.S. and Gorski J.P. (1992) **Calcium and collagen binding properties of osteopontin, bone sialoprotein, and bone glycoprotein-75 from bone** *J. Biol. Chem.* 267, 24871-8
- 219 Sato M., Grasser W., Harm S., Fullenkamp C. and Gorski J.P. (1992) **Bone acidic glycoprotein 75 inhibits resorption activity of isolated rat and chicken osteoclasts** *Faseb J.* 6, 2966-76
- 220 Ohnishi T., Arakaki N., Nakamura O., Hirono S. and Daikuhara Y. (1991) **Purification, characterization, and studies on biosynthesis of a 59-kDa bone sialic acid containing protein (BSP) from rat mandible using a monoclonal antibody** *J. Biol. Chem.* 266, 14636-45
- 221 Wendel M., Heinegard D. and Franzen A. (1993) **A major non-collagenous 62 kDa protein from rat bone mineralized matrix is identical to pp63 a phosphorylated glycoprotein from liver** *Matrix* 13, 331-9
- 222 Franzén A. and Heinegard D. (1985) **Proteoglycans and proteins of rat bone. Purification and biosynthesis of major noncollagenous macromolecules** *The Chemistry and Biology of Mineralized Tissues*, W.T. Butler Ed., EBSCO Media, Birmingham, Alabama 132-41
- 223 Termine J.D., Belcourt A.B., Conn K.M. and Kleinman H.K. (1981) **Mineral and Collagen-binding Proteins of Fetal Calf Bone** *J. Biol. Chem.* 256, 10403-8
- 224 Lane T.F. and Sage E.H. (1994) **The biology of SPARC, a protein that modulates cell-matrix interactions** *FASEB J.* 8, 163-73
- 225 Villareal X.C., Grant B.W. and Long G.L. (1991) **Demonstration of osteonectin mRNA in megacaryocytes : the use of polymerase chain reaction** *Blood* 78, 1216-22
- 226 Clezardin P., Malaval L. and Morel M.C. (1991) **Osteonectin is an α -granule component involved with thrombospondin in platelet aggregation** *J. Bone Miner. Res.* 6, 1059-70
- 227 Stenner D.D., Tracy R.P., Riggs B.L. and Mann K.G. (1986) **Human platelets contain and secrete osteonectin, a major protein of mineralized bone** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 6892-6
- 228 Mason I.J., Taylor A. and Williams J.G. (1986) **Evidence from molecular cloning that SPARC, a major product of mouse embryoparietal endoderm, is related to a endothelial cell « culture shock » glycoprotein of Mr 43,000** *EMBO J.* 5, 1465-72
- 229 Malaval L., Fournier B. and Delmas P.D. (1987) **Radioimmunoassay for osteonectin. Concentrations in bone, non mineralized tissues and blood** *J. Bone Miner. Res.* 2, 457-65
- 230 Domenicucci C., Goldberg H. and Hofmann T. (1988) **Characterization of porcine osteonectin extracted from foetal calvariae** *Biochem. J.* 253, 139-51
- 231 Kuwata F., Yao K.L. and Sodek J. (1985) **Identification of pre-osteonectin produced by cell-free translation of fetal porcine calvarial mRNA** *J. Biol. Chem.* 260, 6993-98
- 232 Villareal X.C., Mann K.G. and Long G.L. (1989) **Structure of human osteonectin based upon analysis of cDNA and genomic sequences** *Biochemistry* 28, 6483-91
- 233 Kelm R.J. Jr. and Mann K.G. (1990) **Human platelet osteonectin : release, surface expression and partial characterization** *Blood* 75, 1105-13
- 234 Kelm R.J. Jr. and Mann K.G. (1991) **The collagen binding specificity of bone and platelet osteonectin is related to differences in glycosylation** *J. Biol. Chem.* 266, 9632-9

- 235 Malaval L., Darbouret B. and Preaudat C. (1991) **Intertissular variations in osteonectin : a monoclonal antibody directed to bone osteonectin shows reduced affinity for platelet osteonectin** *J. Bone Miner. Res.* 6, 315-23
- 236 Maillard C, Malaval L, and Delmas P.D. (1992) **Immunological screening of SPARC osteonectin in non mineralized tissues** *Bone* 13, 257-64
- 237 Engel J., Taylor W., Paulsson M., Sage H. and Hogan B. (1987) **Calcium binding domains and calcium-induced conformational transition of SPARC/BM-40/Osteonectin, an extracellular glycoprotein expressed in mineralized and nonmineralized tissues** *Biochem.* 26, 6958-65
- 238 Romberg R.W., Werness P.G., Lollar P., Riggs B.L. and Mann K.G. (1985) **Isolation and characterization of native adult osteonectin** *J. Biol. Chem.* 260, 2728-36
- 239 Xie R.L. and Long G.L. (1995) **Role of N-linked glycosylation in human osteonectin** *J. Biol. Chem.* 270, 23212-7
- 240 Sage H., Vernon R.B. and Decker J. (1989) **Distribution of the calcium binding protein SPARC in tissues of embryonic and adult mice** *J. Histochem. Cytochem.* 37, 819-29
- 241 Young M.F., Day A.A., Gehron Robey P. and Termine J.D. (1990) **Interaction of osteonectin and type I collagen in bone cells** *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 580, 526-8
- 242 Sage H., Johnson C. and Bornstein P. (1984) **Characterization of a novel serum albumin-binding glycoprotein secreted by endothelial cells in culture** *J. Biol. Chem.* 259, 3993-4007
- 243 Clezardin P., Malaval L., Ehrensperger A-S., Delmas P., Dechavanne M. and McGregor J.L. (1988) **Complex formation of human thrombospondin with osteonectin** *Eur. J. Biochem.* 175, 275
- 244 Bianco P., Sivestrini G., Termine J.D. and Bonucci E. (1988) **Immunohistochemical localization of osteonectin in developing human and calf bone using monoclonal antibodies** *Calcif. Tissue Int.* 43, 155-61
- 245 Romanowski R., Jundt G., Termine J.D., von der Mark K. and Schulz A. (1990) **Immunoelectron microscopy of osteonectin and type I collagen in osteoblasts and bone matrix** *Calcif. Tissue Int.* 46, 353-60
- 246 Wrana J.L., Maeno M., Hawrylyshyn B., Yao K.L., Domenicucci C. and Sodek J. (1988) **Differential effects of transforming growth factor- β on synthesis of extracellular matrix proteins by normal foetal calvarial bone cell population** *J. Cell. Biol.* 106, 915-24
- 247 Gehron Robey P., Findlay D.M., Young M.F., Beresford J.N., Stubbs J., Fisher L.W. and Termine J.D. (1986) **Regulation of osteonectin production by 1,25-dihydroxyvitamin D3 in human bone cells** *J. Bone Miner. Res.* 1, 288
- 248 Yost J.C. and Sage H. (1993) **Specific interaction of SPARC with endothelial cells is mediated through a carboxyl-terminal sequence containing a calcium-binding EF hand** *J. Biol. Chem.* 268, 25790-6
- 249 Funk S.E. and Sage E.H. (1991) **The Ca²⁺-binding glycoprotein SPARC modulates cell cycle progression in bovine aortic endothelial cells** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 2648-52
- 250 Raines E.W., Lane T.F. and Iruela-Arispe M. (1992) **The extracellular glycoprotein SPARC interacts with platelet-derived growth factor (PDGF)-AB and -BB, and inhibits the binding of PDGF to its receptors** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 1281-5
- 251 Grzesik W., Mintz K.P. and Gehron Robey P. (1991) **The interaction of human bone cells and extracellular matrix glycoproteins in vitro** *J. Bone Min. Res.* 6, S158

- 252 Clezardin P., Jouishomme H., Chavassieux P. and Marie P.J. (1989) **Thrombospondin is synthesized and secreted by human osteoblasts and osteosarcoma cells. A model to study the different effects of thrombospondin in cell adhesion** *Eur. J. Biochem.* 182, 721-6
- 253 Bornstein P. and Sage E.H. (1994) **Thrombospondins** *Methods Enzymol.* 245, 62-85
- 254 Clezardin P., Malaval L., Ehrensperger A-S., Delmas P., Dechavanne M. and McGregor J.L. (1988) **Complex formation of human thrombospondin with osteonectin** *Eur. J. Biochem.* 175, 275-84
- 255 Hynes R.O. (1985) **Molecular biology of fibronectin** *Ann. Rev. Cell Biol.* 1, 67-90
- 256 Gronowicz G.A., Derome M.E. and McCarthy M.B.V. (1991) **Glucocorticoids inhibit fibronectin synthesis and messenger ribonucleic acid levels in cultured foetal rat parietal bones** *Endocrinology* 185, 1107-14
- 257 Mackie E.J. and Tucker R.P. (1992) **Tenascin in bone morphogenesis : expression by osteoblasts and cell type specific expression of splice variants** *J. Cell. Science* 103, 765-71
- 258 Schenk S. and Chiquet-Ehrismann R. (1994) **Tenascins** *Methods in Enzymol.* 245, 52-61
- 259 Delmas P.D., Tracy R., Riggs B. and Mann K. (1984) **Identification of the non collagenous proteins of bovine bone by two-dimensional gel electrophoresis** *Calcif. Tissue Int.* 36, 308-16
- 260 Heremans J.F. (1960) **Les globulines sériques du système gamma** Heremans J.F., Ed. *Arschia Bruxelles* pp.103-5
- 261 Schmid K. and Bürigi W. (1961) **Preparation and properties of the human plasma B-alpha 2-Glycoproteins** *Biochim. Biophys. Acta* 47, 440-53
- 262 Lee C.C., Bowman B.H. and Yang F. (1987) **Human alpha 2 HS glycoprotein : the A and B chains with a connecting sequence are encoded by a single chain mRNA transcript** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 4403-7
- 263 Yoshioka Y., Gejyo F., Marti T., Rickli E.E., Bürigi W., Offner G.D., Troxler R.F. and Schmid K. (1986) **The complete amino acid sequence of the A-chain of human plasma alpha 2 HS-glycoprotein** *J. Biol. Chem.* 261, 1665-76
- 264 Elzanowski A., Barker W.C., Hunt L.T. and Seibel-Ross E. (1988) **Cystatin domains in alpha 2 HS-Glycoprotein and fetuin** *FEBS Lett.* 227, 167-70
- 265 Gejyo F., Chang J-L., Bürigi W., Schmid K., Offner G.D., Troxler R.F. and Vliegenthart A. (1983) **Characterization of the B-chain of human plasma alpha 2 HS-Glycoprotein. The complete amino acid sequence and primary structure of its heteroglycan** *J. Biol. Chem.* 258, 4966-71
- 266 Dickson I.R. and Bagga M.K. (1985) **Changes with age in the non-collagenous proteins of human bone** *Connect. Tissue Res.* 14, 77-85
- 267 Wilson J.M., Ashton B. and Triffitt J.T. (1977) **The interaction of a component of bone organic matrix with the mineral phase** *Calcif. Tissue Res.* 22, 458-60
- 268 Van Oss C.J., Gillman C.F., Bronson P.M. and Border J.R. (1974) **Opsonic properties of human serum alpha 2-HS-glycoprotein** *Immunol. Commun.* 3, 329-35
- 269 Coclasure G.C., Lloyd W.S., Lamkin M., Gonnerman W., Troxler R.F., Offner G.D., Bürigi W., Schmid K. and Nimberg R.G. (1988) **Human Serum α_2 HS-Glycoprotein Modulates in Vitro Bone Resorption** *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 66, 187-92
- 270 Daveau M., Davrinche C., Julien N., Hiron M., Arnaud P. and Lebreton J.P. (1988) **The synthesis of human alpha-2-HS glycoprotein is down-regulated by cytokines in hepatoma HepG2 cells** *Febs Lett.* 241, 191-4
- 271 Hayase T., Rice K.G., Dziegielewska K.M., Kuhlenschmidt M., Reilly T. and Lee Y.C. (1992) **Comparison of N-glycosides of fetuins from different species and human alpha 2-HS-glycoprotein** *Biochemistry* 31, 4915-21

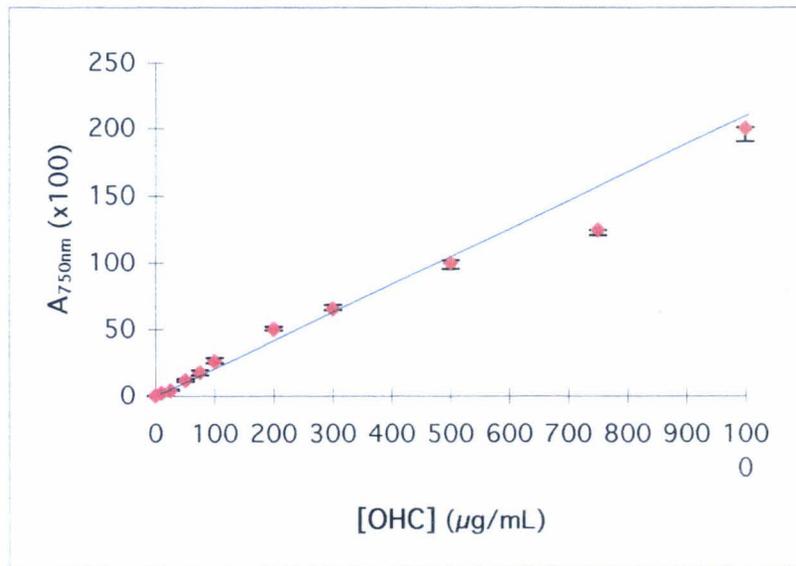
- 272 Pedersen K.O. (1944) *Nature (London)* 154, 575
- 273 Brown W.M., Dziegielewska K.M., Saunders N.R., Christie D.L., Nawratil P. and Müller-Esterl W. (1992) **The nucleotide and deduced amino acid structures of sheep and pig fetuin. Common structural features of the mammalian fetuin family** *Eur. J. Biochem.* 205, 321-31
- 274 Christie D.L., Dziegielewska K.M., Hill R.M. and Saunders N.R. (1987) **Fetuin : the bovine homologue of human alpha 2 HS glycoprotein** *Febbs Lett.* 214, 45-9
- 275 Dziegielewska K.M., Brown W.M., Casey S.J., Christie D.L., Foreman R.C., Hill R.M. and Saunders N.R. (1990) **The complete cDNA and amino acid sequence of bovine fetuin. Its homology with alpha 2 HS glycoprotein and relation to other members of the cystatin superfamily** *J. Biol. Chem.* 265, 4354-7
- 276 Spiro R.G. and Bhoyroo V.D. (1974) **Structure of the O-glycosidically linked carbohydrate units of fetuin** *J. Biol. Chem.* 249, 5704-17
- 277 Yet M.G., Chin C.C.Q. and Wold F. (1988) **The covalent structure of individual N-linked glycopeptides from ovomucoid and asialofetuin** *J. Biol. Chem.* 263, 111-17
- 278 Heersche J.N.M. and Reimers S. (1991) **Changes in expression of alpha1 type 1 collagen and osteocalcin mRNA in osteoblasts and odontoblasts at different stages of maturity as shown by in situ hybridization** *Proc. Finn. Dent. Soc.* 88, 173-82
- 279 Kobata A. (1992) **Structures and functions of the sugar chains of glycoproteins** *Eur. J. Biochem.* 209, 483-501
- 280 Lis H. and Sharon N. (1993) **Protein glycosylation. Structural and functional aspects** *Eur. J. Biochem.* 218, 1-27.
- 281 Cummings R.D. (1992) **Synthesis of asparagine-linked oligosaccharides : pathways, genetics and metabolic regulation** *Glycoconjugates : composition, structure and function* (Allen H.J. and Kisailus E.C., eds) Marcel Dekker Inc, New York, 333-60
- 282 Montreuil J. (1982) **Glycoproteins** *Comprehensive biochemistry. Neuberger A and Van Deenen LLM, eds. Elsevier, Amsterdam.* vol 19B, part II, 1-188
- 283 Finne J. (1982) **Occurrence of unique polysialosyl carbohydrate units in glycoproteins of developing brain** *J. Biol. Chem.* 257, 11966-70
- 284 Anderson H.C., Matsuzawa T., Sajdera S.W. and Ali S.Y. (1970) **Membranous particles in calcifying cartilage matrix** *Trans. NY Acad. Sci.* 32, 619-30
- 285 Kobata A. and Takasaki S. (1992) **Structure and biosynthesis of cell surface carbohydrates** *Cell surface carbohydrates and cell development* (Fukuda M., ed.) CRC Press, London, 1-24
- 286 Feizi T. (1980) **Structural and biological aspects of blood group I and i antigens on glycolipids and glycoproteins** *Blood transfusion and immunohaematology*, 23, 563-77
- 287 Krusius T., Finne J. and Rauvala H. (1978) **The poly(glycosyl) chains of glycoproteins. Characterization of a novel type of glycoprotein saccharides from human erythrocyte membrane** *Eur. J. Biochem* 92, 289-300
- 288 Fukuda M., Dell A., Oates J.E. and Fukuda M.N. (1984) **Structure of branched lactosaminoglycan, the carbohydrate moiety of band 3 isolated from adult human erythrocytes** *J. Biol. Chem.* 259, 8260-73
- 289 Finne J., Breimer M.E., Hansson G.C., Karlsson K.A., Leffler H., Vliengenthart J.F.G. and van Halbeek H. (1989) **Novel polyfucosylated N-linked glycopeptides with blood group A, H, X and Y determinants from human small intestinal epithelia cells** *J. Biol. Chem.* 264, 5720-35
- 290 Hounsell E.F. and Feizi T. (1982) **Gastrointestinal mucins. Structures and antigenicities of their carbohydrate chains in health and disease** *Med. Biol.* 60, 227-36

- 291 Carlson D.M. (1968) **Structures and immunochemical properties of oligosaccharides isolated from pig submaxillary mucins** *J. Biol. Chem.* 243, 616-26
- 292 Hounsell E.F., Lawson A.M., Feeney J., Gooi H.C., Pickering N.J., Stoll M.S., Lui S.C. and Feizi T. (1985) **Structural analysis of the O-glycosidically linked core-region oligosaccharides of human meconium glycoproteins which express oncofoetal antigens** *Eur. J. Biochem.* 148, 367-77
- 293 Kurosaka A., Nakajima H., Funakoshi I., Matsuyama M., Nagayo T. and Yamashina I. (1983) **Structures of the major oligosaccharides from a human rectal adenocarcinoma glycoproteins** *J. Biol. Chem.* 258, 11594-8
- 294 Slomiany B.L., Zdebska E. and Slomiany A. (1984) **Structural characterization of neutral oligosaccharides of human H⁺Le^{b+} gastric mucin** *J. Biol. Chem.* 259, 2863-99
- 295 Chai W., Hounsell E.F., Cashmore G.C., Rosankiewicz J.R., Bauer C.J., Feeney J., Feizi T. and Lawson A.M. (1992) **Neutral oligosaccharides of bovine submaxillary mucin. A combined mass spectroscopy and ¹H-NMR study** *Eur. J. Biochem.* 203, 257-68
- 296 Schachter H. and Williams D. (1982) **Biosynthesis of mucus glycoproteins** *Mucus health and disease*. Chantler E.N., Elder J.B. and Elstein M., eds. Plenum press, New York 2, 3-28
- 297 Carlson D.M., Mc Guire E.J., Jourdian G.N. and Rosemans S. (1973) **The sialic acids. XVI. Isolation of a mucin sialyltransferase from sheep submaxillary gland** *J. Biol. Chem.* 248, 5763-73
- 298 Lhermitte M., Rahmoune H., Lamblin G., Roussel P., Strang A.M. and van Halbeek H. (1991) **Structures of neutral oligosaccharides isolated from the respiratory mucins of a non-secretor (P, Le^{a+b-}) patient suffering from chronic bronchitis** *Glycobiology* 1, 277-93
- 299 Rana S.S., Chandrasekaran E.V., Kennedy J. and Mendicino J. (1984) **Purification and structures of oligosaccharide chains in swine trachea and cowper's gland mucin glycoproteins** *J. Biol. Chem.* 259, 12899-907
- 300 Watkins W.M. (1980) **Biochemistry and genetics of the ABO, Lewis and P blood-group systems** *Advances in human genetics*. Harris H. and Hirschorn K., eds. Plenum Publishing Co., New York 10, 1-136 and 379-85
- 301 Low M.G., Ferguson M.A.J., Futerman A.H. and Silman I. (1986) **Covalently attached phosphatidylinositol as a hydrophobic anchor for membrane proteins** *Trends Biochem. Sci.* 11, 212-5
- 302 Lowry O.H. (1951) *J. Biol. Chem.* 193, 265-75
- 303 Laemmli U.K. (1970) **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4** *Nature* 227, 680-5
- 304 Merrill C.R., Goldman D., Sedman S.A. and Ebert M.H. (1981) **Ultrasensitive stain for proteins in polyacrylamide gels shows regional variation in cerebrospinal fluid proteins** *Science* 211, 1437-8
- 305 Anderson L. and Anderson N.G. (1977) **High resolution two-dimensional electrophoresis of human plasma proteins** *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 74, 5421-5
- 306 Zanetta J.P., Vitello F. and Vincendon G. (1980) **Gangliosides from rat cerebellum : demonstration of considerable heterogeneity using a new solvent for thin layer chromatography** *Lipids* 15, 1055-61
- 307 Blumenkrantz N. and Asboe-Hansen G. (1973) **New method for quantitative determination of uronic acids** *Analytical Biochemistry* 54, 484-9
- 308 LoGuidice J.M., Wieruszkeski J-M., Lemoine J., Verbert A., Roussel P. and Lamblin G. (1994) **Sialylation and sulfatation of the carbohydrate chains in respiratory mucins from a patient with cystic fibrosis** *J. Biol. Chem.* 269, 18794-813

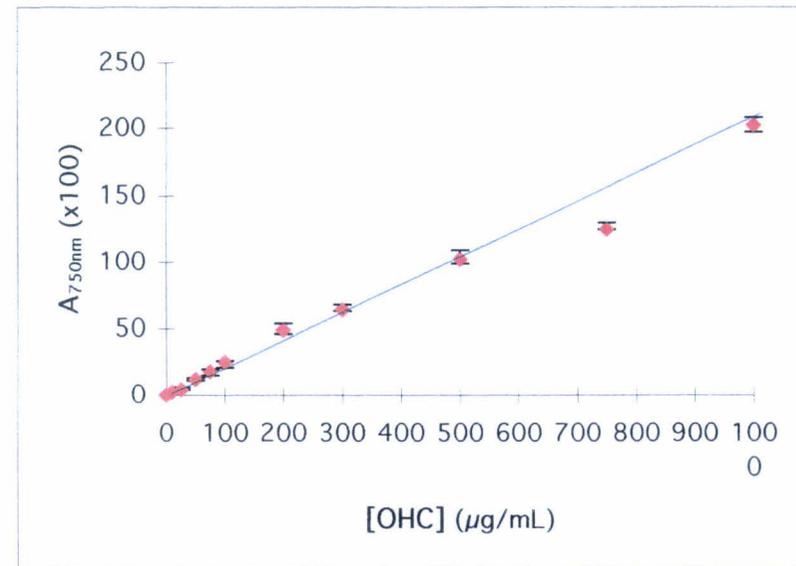
- 309 Fisher L.W. and Termine J.D. (1985) **Purification of the noncollagenous proteins from bone : technical pitfalls and how to avoid them** *Current advances in skeletogenesis*. Elsevier Science Publishers B.V. 467-72
- 310 Hellman U., Wernstedt C., Gonez J. and Heldin C.H. (1994) **Improvement of an "in-gel" digestion procedure for the micropreparation of internal protein fragments for amino acid sequencing** *Anal. Biochem.* 224, 451-5
- 311 Tanaka K. and Pigman W. (1965) **Improvements in hydrogenation procedure for demonstration of O-threonin glycosidic linkages in bovine submaxillary mucin** *J. Biol. Chem.* 240, 1487-9
- 312 Likhosterstov L.M., Novikova O.S., Derevitskaya V.A. and Kochetkov N.K. (1990) **A selective method for sequential splitting of O- and N-linked glycans from N, O-glycoproteins** *Carbohydr. Res.* 199, 67-76
- 313 Bendiak B. and Cumming D.A. (1986) **Purification of oligosaccharides having a free reducing-end from glycopeptide sources** *Carbohydr. Res.* 151, 89-103
- 314 Delmas P.D., Tracy R., Riggs B. and Mann K. (1984) **Identification of the non collagenous proteins of bovine bone by two-dimensional gel electrophoresis** *Calcif. Tissue Int.* 36, 308-16
- 315 Iwamori M., Chimomura J., Tsuyuhara S. and Nagai Y. (1984) **Gangliosides of various rat tissues : distribution of ganglio-N-tetraose-containing gangliosides and tissue-characteristic composition of gangliosides** *J. Biochem.* 95, 761-70
- 316 Fisher L.W., Gehron Robey P., Young M.F. and Termine J.D. (1987) **Bone glycoproteins** *Methods Enzymol.* 145, 269-289
- 317 Arnaud P., Emerson D.L. and Gianazza E. (1983) **Interaction of alpha 2 HS-Glycoprotein with immobilized triazine dyes** *Biochim. Biophys. Acta* 749, 270-5
- 318 Arnaud P., Miribel L. and Emerson D.L. (1988) **Alpha 2 HS Glycoprotein** *Methods in Enzymology* 163, 431-41
- 319 Christie D.L., Dziegielewska K.M., Hill R.M. and Daunders N.R. (1987) **Fetuin : the bovine homologue of human alpha 2 HS glycoprotein** *Febbs Lett.* 214, 45-9
- 320 Hering T.M., Kollar J., Huynh T.D. and Sandell L.J. (1995) **Bovine chondrocyte link protein cDNA sequence : interspecies conservation of primary structure and mRNA untranslated regions** *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 112, 197-203
- 321 Watzlawick H., Walsh M.T., Yoshioka Y., Schmid K. and Brossmer R. (1992) **Structure of the N- and O-Glycans of the A chain of human plasma Alpha 2 HS-Glycoprotein as deduced from the chemical compositions of the derivatives prepared by stepwise degradation with exoglycosidases** *Biochemistry* 31, 12198-203

Annexes

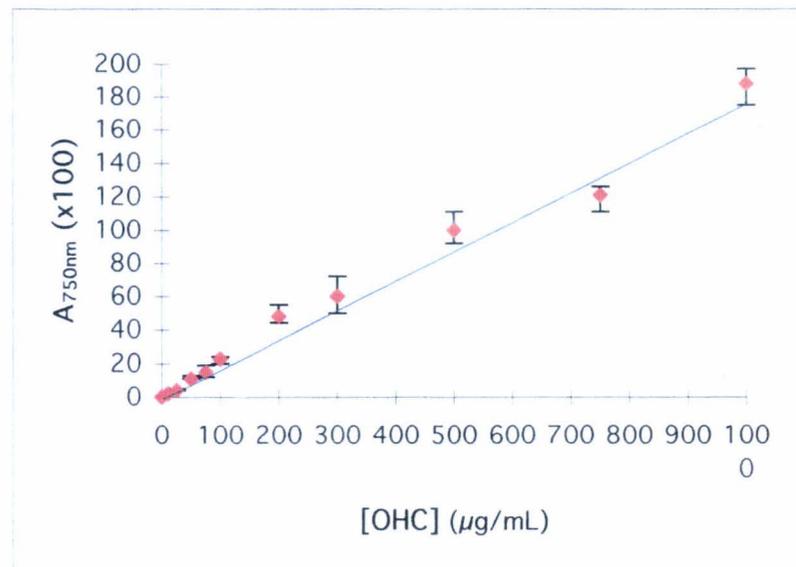
Etude de la robustesse de la méthode modifiée de dosage des protéines de l'OHC selon Lowry à 50°C



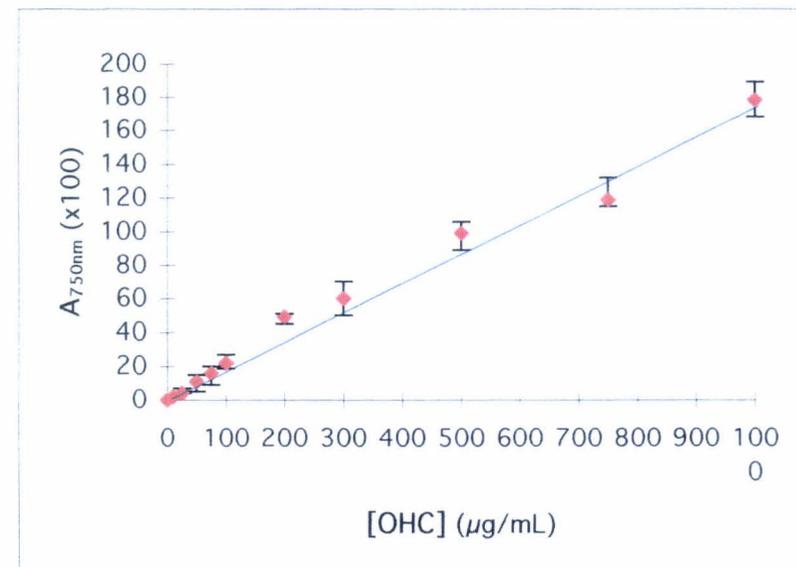
Solubilisation 5 minutes à 50°C



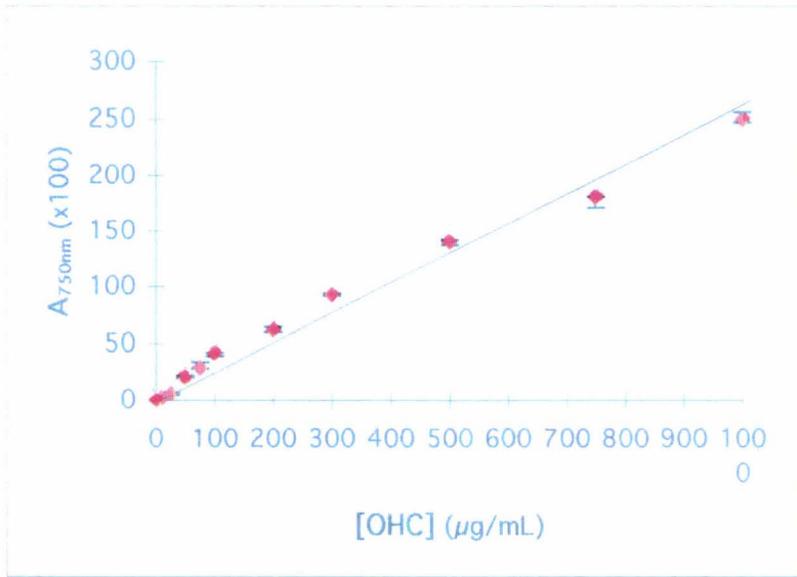
Solubilisation 10 minutes à 50°C



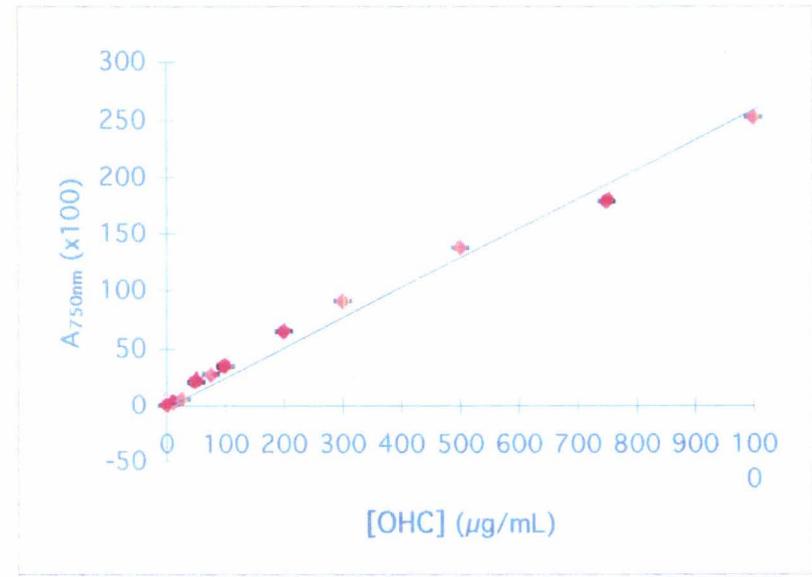
Solubilisation 15 minutes à 50°C



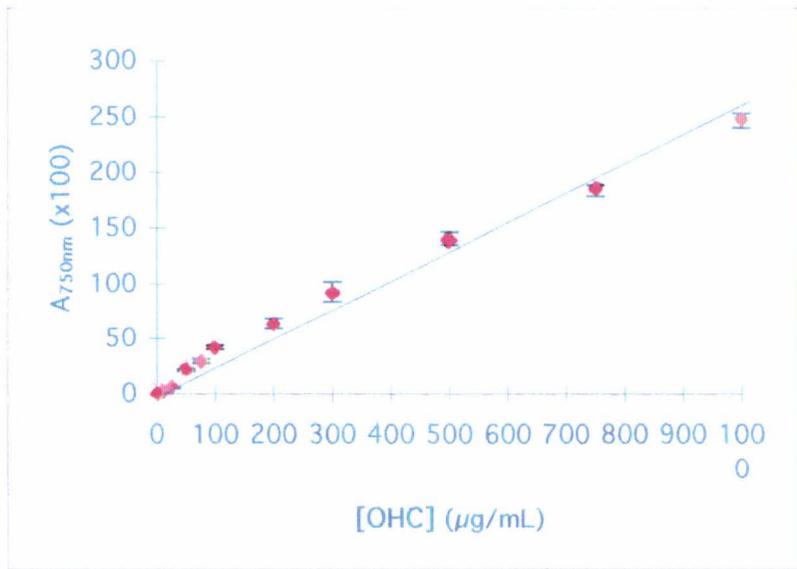
Solubilisation 30 minutes à 50°C



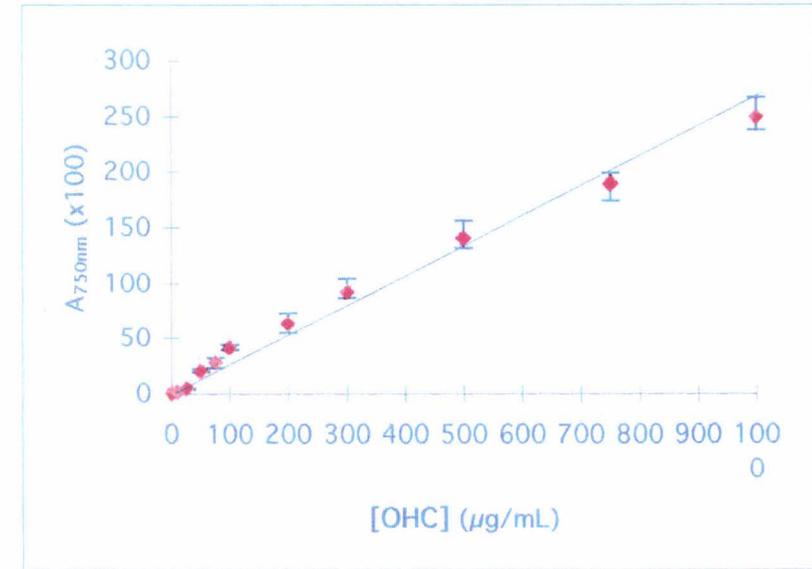
Solubilisation 5 minutes à 100°C



Solubilisation 10 minutes à 100°C

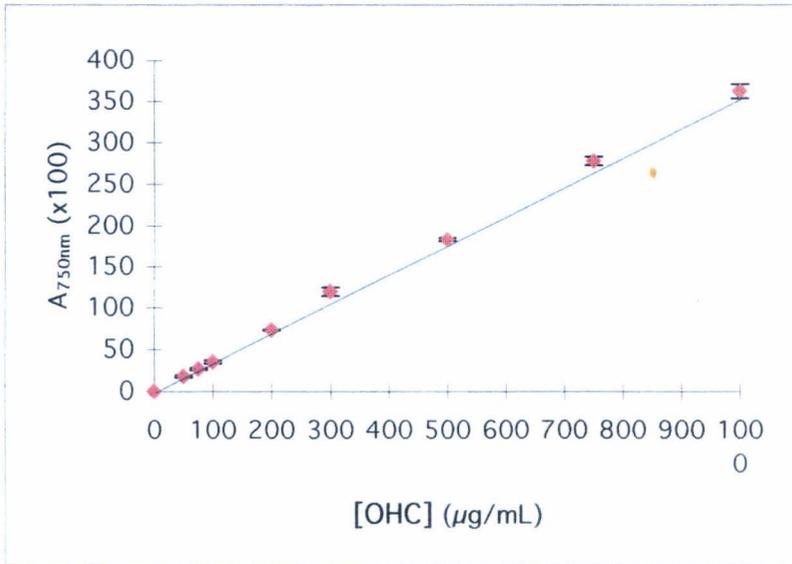


Solubilisation 15 minutes à 100°C

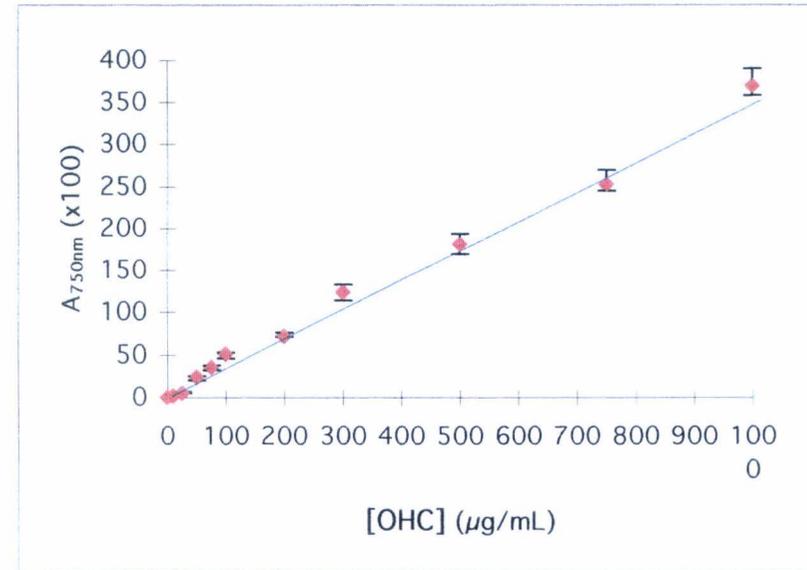


Solubilisation 30 minutes à 100°C

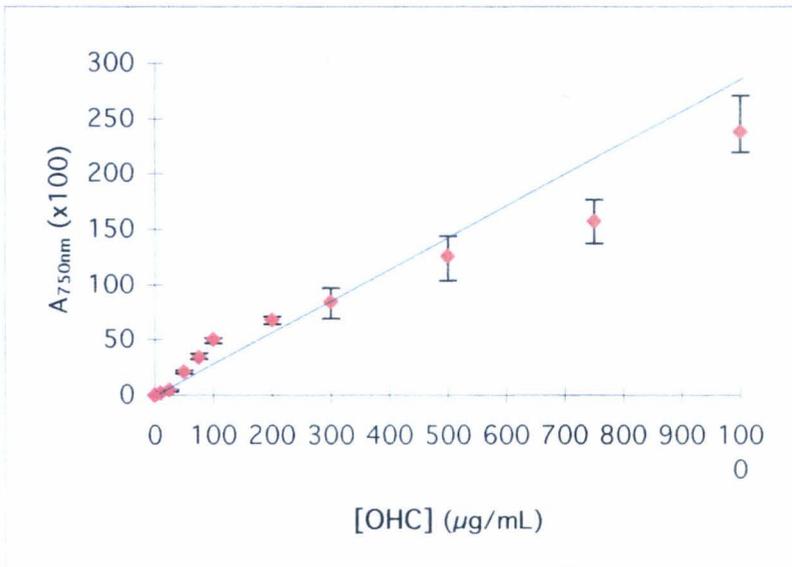
Etude de la robustesse de la méthode modifiée de dosage des protéines de l'OHC selon Lowry à 125°C



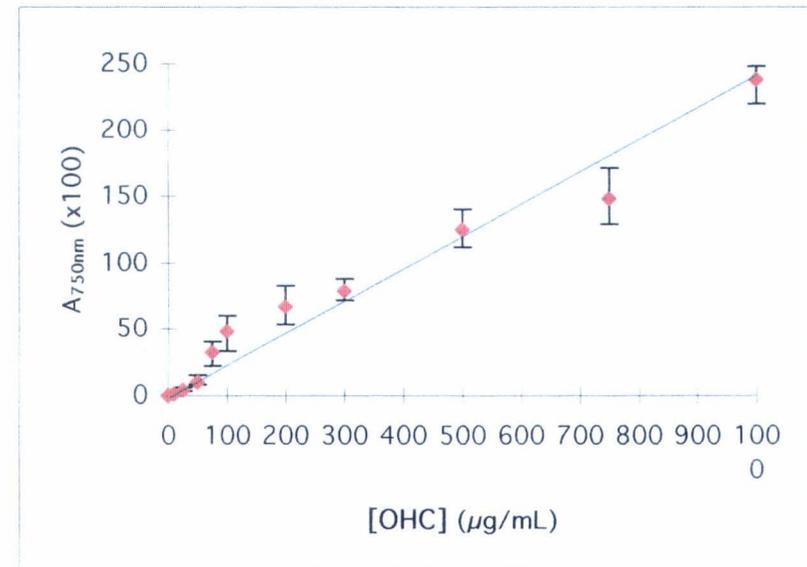
Solubilisation 5 minutes à 125°C



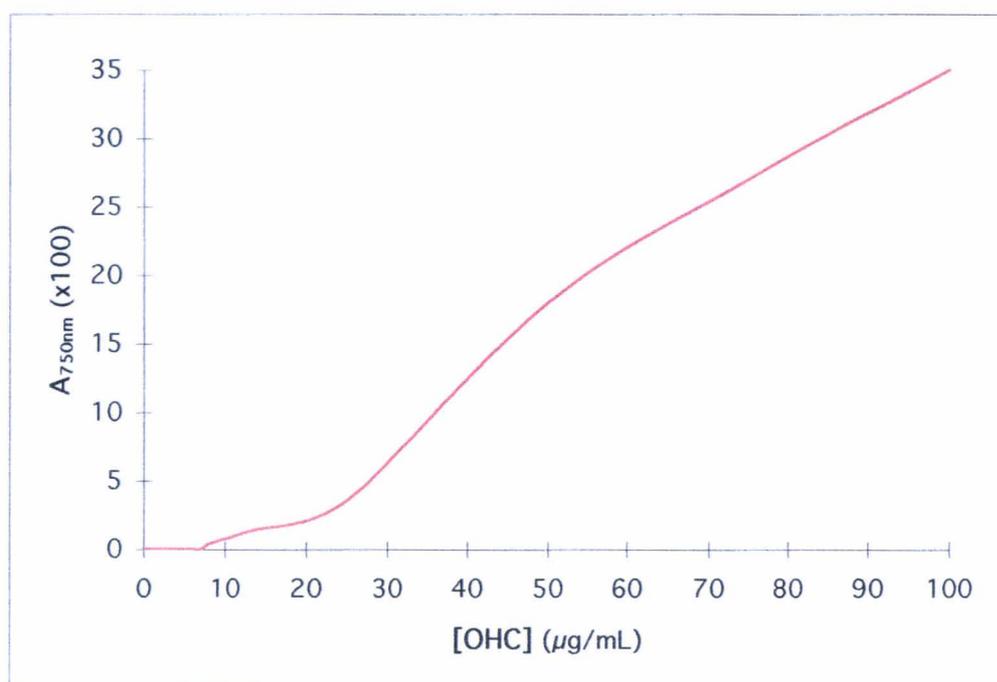
Solubilisation 10 minutes à 125°C



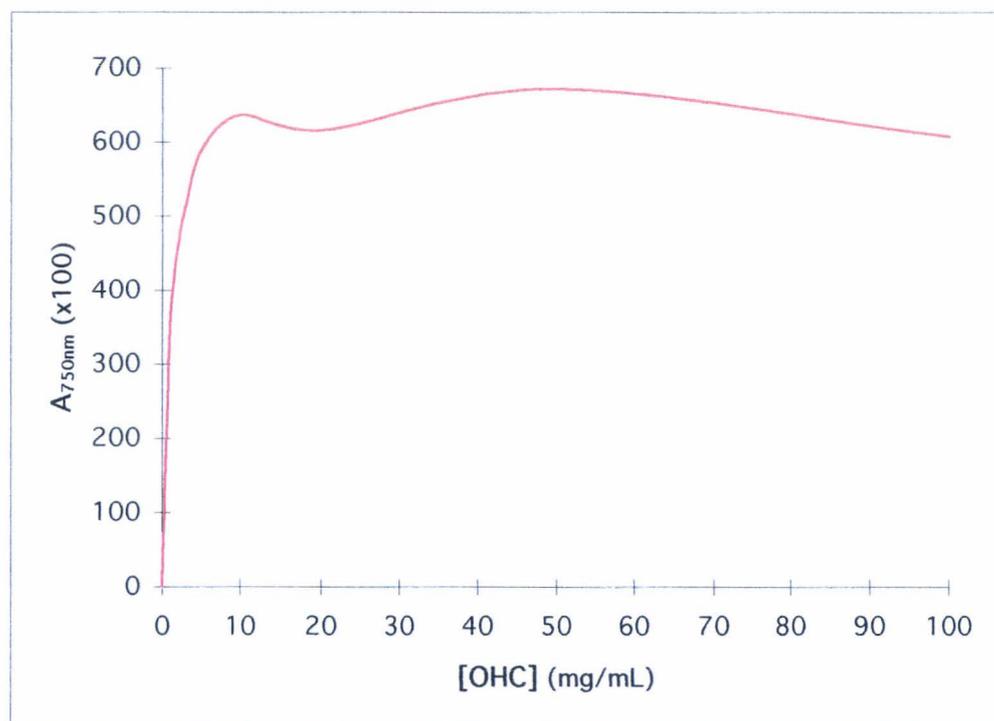
Solubilisation 15 minutes à 125°C



Solubilisation 30 minutes à 125°C



Limite de détection inférieure de la méthode modifiée de dosage des protéines de l'OHC selon Lowry (5min-125°C).



Limite de détection supérieure de la méthode modifiée de dosage des protéines de l'OHC selon Lowry (5min-125°C).

MultAlin

Multalin result page

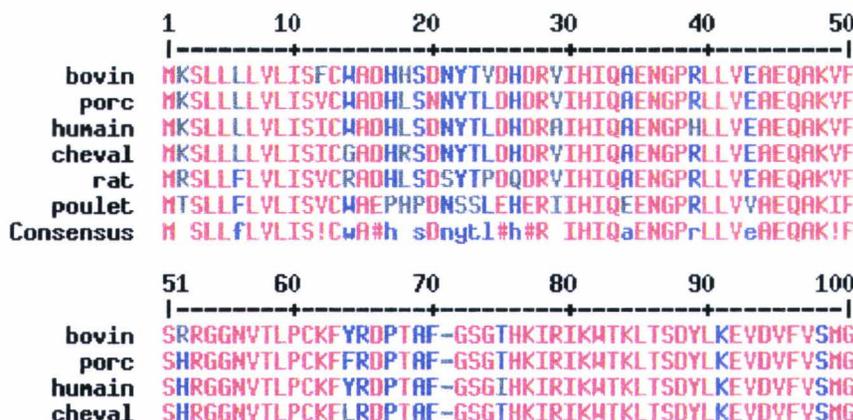
			
---	---	---	--

[Go directly to Alignment](#)

Multalin version 5.3.3
 Copyright I.N.R.A. France 1989, 1991, 1994, 1996
 Published research using this software should cite
 Multiple sequence alignment with hierarchical clustering
 F. CORPET, 1988, Nucl. Acids Res., 16 (22), 10881-10890
 Symbol comparison table: blosum62
 Gap weight: 12
 Gap length weight: 2
 Consensus levels: high=90% low=50%
 Consensus symbols:
 ! is anyone of IV
 \$ is anyone of LM
 % is anyone of FY
 # is anyone of NDQEBZ

MSF:	355	Check:	0	..			
Name:	bovin	Len:	355	Check:	5611	Weight:	0.29
Name:	porc	Len:	355	Check:	4032	Weight:	0.29
Name:	humain	Len:	355	Check:	4693	Weight:	0.63
Name:	cheval	Len:	355	Check:	4749	Weight:	0.86
Name:	rat	Len:	355	Check:	5553	Weight:	1.28
Name:	poulet	Len:	355	Check:	5632	Weight:	2.65
Name:	Consensus	Len:	355	Check:	7249	Weight:	6.00

//



```

rat      SHRGGNVTLPCKFYRDPTAF-GSGIHKIRIKWTKLTSOYLREVDVYFVSHG
poulet  SQRGGNVTLPCKFYHEHTSTAGSGTHKIRYKWKTKLTSOYLKEVDVYFVANG
Consensus SHRGGNVTLPCKFYr#pTaf GSGtHKIR!KWKTKLTSOYLkEVDVYFvSHG

      101      110      120      130      140      150
      |-----+-----+-----+-----+-----|
bovin   YHKKTYGGYHGRVFLKGGSDNDASLYITDLTLEDYGRYKCEYIEGLEDDT
porc    YHKKTYGGYHGRVFLKGGSDNDASLYITDLTLEDYGRYKCEYIEGLEDDT
humain  YHKKTYGGYQGRVFLKGGSDSDASLYITDLTLEDYGRYKCEYIEGLEDDT
cheval  YHKKTYGGYQGRVFLKGGSDNDASLYITDLTLEDYGRYKCEYIEGLEDDT
rat     YHKKTYGGYQGRVFLKGGSDNDASLIITDLTLEDYGRYKCEYIEGLEDDT
poulet  HHRKSYGKYQGRVFLRESSENNDASLIITNIMLEDYGRYKCEYIEGLEDDT
Consensus yHkKtYgGyQGRVFLkggS#nDASL!IT#ItL#DYGRYKCEYIEGLEDDT

      151      160      170      180      190      200
      |-----+-----+-----+-----+-----|
bovin   AVVALDLQGVVFPYFPRLGRYNLFHEAQQACLDDQDAVIASFQQLYDAWR
porc    AVVALDLQGVVFPYFPRLGRYNLFHEAQQACLDDQDAVIASFQQLYDAWR
humain  VYVALDLQGVVFPYFPRLGRYNLFHEAQQACLDDQDAVIASFQQLYDAWR
cheval  AVVALDLQGVVFPYFPRLGRYNLFHEAQQACLDDQDAVIASFQQLYDAWR
rat     AVVALELQGVVFPYFPRLGRYNLFHEARQACLDDQDAVIASFQQLYDAWR
poulet  AVVALNLEGVVFPYSPRLGRYNLFHEAQQACLDDQDAVIASFQQLYDAWR
Consensus aVVAL#L#GVVFPYFPRLGRYNLFHEAqQACLDDQa!IASFQQLY#AWR

      201      210      220      230      240      250
      |-----+-----+-----+-----+-----|
bovin   SGLDMCNAGHLSDGSVQYPITKPREPCGGQNTVPGYRNYGFWDKDKSRYD
porc    GGLDMCNAGHLSDGSVQYPITKPREPCGGQNTVPGYRNYGFWDKDKSRYD
humain  GGLDMCNAGHLSDGSVQYPITKPREPCGGQNTVPGYRNYGFWDKDKSRYD
cheval  GGLDMCNAGHLSDGSVQYPITKPREPCGGQNTVPGYRNYGFWDKEKSRYD
rat     GGLDMCNAGHLSDGSVQYPITKPREPCGGQNTVPGYRNYGFWDKDKSRYD
poulet  SGLDMCNAGHLSDGSVQYPITKPREPCGGKNTVPGYRNYGFWDKERSRYD
Consensus gGLDMCNAGHLSDGSVQYPITKPREPCGGqNTVPGYRNYGFWDK#kSRYD

      251      260      270      280      290      300
      |-----+-----+-----+-----+-----|
bovin   VFCFTSNFNGRFYLLIHP TKLYDEAVQAQLNDGAQIAKVGGQIFAAHKLL
porc    VFCFTSNFNGRFYLLIHP TKLYDEAVQAQLNDGAQIAKVGGQIFAAHKLL
humain  VFCFTSNFNGRFYLLIHP TKLYDEAVQAQLNDGAQIAKVGGQIFAAHKIL
cheval  VFCFTSNFNGRFYLLIHP TKLYDEAVQAQLKDGQAQIAKVGGQIFAAHKLL
rat     VFCFTSNFNGRFYLLIHP TKLYDEAVQAQLNDGAQIAKVGGQIFAAHKLL
poulet  VFCFTSNFNGRFYLLIHP TKLYDEAVQAQLKDGQAQIAKVGGQIFAAHKLL
Consensus VFCFTSNFNGRFYLLIHP TKLYDEAVQAQLkDGQAQIAKVGGQIFAAHKLL

      301      310      320      330      340      350
      |-----+-----+-----+-----+-----|
bovin   GYDRCDAGHLADGSVRYPISRPRRRCSPSEAAVRFYVGFPOKHKHLYGVYC
porc    GYDRCDAGHLADGSVRYPISRPRRRCSPNEAAVRFYVGFPOKHKHLYGVYC
humain  GYDRCDAGHLADGSVRYPISRPRRRCSPTEAAVRFYVGFPOKHKHLYGVYC
cheval  GYDRCDAGHLADGSVRYPISRPRRRCSPTEAAVRFYVGFPOKHKHLYGVYC
rat     GYDRCDAGHLADGSVRYPISRPRRRCSPTEAAVRFYVGFPOKHKHLYGVYC
poulet  GYDRCDAGHLADGSVRYPISRPRRCSPNEAAVRFYVGFPOKHKHLYGVYC
Consensus GYDRCDAGHLADGSVRYPISRPRrRCSP EAARVRFYVGFPOKHKHLYGVYC

      35155
      |---|
bovin   FRAYN
porc    FRAYN
humain  FRAYN
cheval  FRAYN
rat     FRAYN
poulet  FRAYN
Consensus FRAYN

```



Information files :

- [Aligned sequence file](#)
- [Sequence Input file](#)
- [Cluster file](#)
- [Result in text format](#)