

UNIVERSITE DE NANTES

FACULTE DE MEDECINE ET PHARMACIE

**ROLE DES MONOCYTES / MACROPHAGES DANS  
LES PROCESSUS D'OSSIFICATION  
PHYSIOPATHOLOGIQUE**

**THESE DE DOCTORAT**

**Ecole Doctorale BIOLOGIE-SANTE  
Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie**

*présentée  
et soutenue publiquement par*

**Pierre GUIHARD**

**le 26 Octobre 2012, devant le jury ci-dessous**

**Rapporteurs**

**Pr. MAGNE David**

**Professeur des Universités, Lyon**

**Dr. MALAVAL Luc**

**Chargé de Recherche, Saint-Etienne**

**Examineurs**

**Pr. LECRON Jean-Claude**

**Professeur des Universités, Poitiers**

**Dr. LAYROLLE Pierre**

**Directeur de Recherche INSERM, Nantes**

**Directeurs de thèse**

**Dr. BLANCHARD Frédéric**

**Chargé de Recherche INSERM, Nantes**

**Dr. GASCAN Hughes**

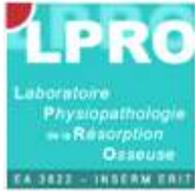
**Directeur de Recherche INSERM, Angers**

# TABLE DES MATIERES

<b>INTRODUCTION</b> .....	1
<b>PARTIE I : LE TISSU OSSEUX</b> .....	2
A.    ORGANISATION DU TISSU OSSEUX .....	3
1. <i>Organisation macroscopique</i> .....	3
2. <i>Organisation microscopique</i> .....	5
B.    CROISSANCE OSSEUSE.....	22
1. <i>Ossification primaire</i> .....	22
2. <i>Ossification secondaire</i> .....	23
C.    REMODELAGE OSSEUX .....	25
1. <i>Les étapes du remodelage osseux</i> .....	25
2. <i>Régulation du remodelage osseux</i> .....	27
3. <i>Nouveaux concepts</i> .....	30
<b>PARTIE II : LES MONOCYTES / MACROPHAGES EN SITE OSSEUX</b> .....	33
A.    LES MONOCYTES : PRECURSEURS MACROPHAGIQUES .....	34
1. <i>Origine et différenciation</i> .....	34
2. <i>Hétérogénéité et fonctions des monocytes</i> .....	35
3. <i>Des monocytes aux macrophages</i> .....	37
B.    LA POLARISATION DES MACROPHAGES .....	38
1. <i>Nomenclature</i> .....	38
2. <i>Les macrophages M1</i> .....	38
3. <i>Les macrophages M2</i> .....	39
C.    LES MACROPHAGES RESIDENTS EN SITE OSSEUX : LES OSTEOMACS .....	40
1. <i>Rôles</i> .....	41
2. <i>Contrôle du (re)modelage osseux</i> .....	44
3. <i>Remodelage osseux pathologique</i> .....	46
<b>PARTIE III : CONSOLIDATION DES FRACTURES &amp; STRATEGIES ANABOLIQUES</b> .....	48
A.    LES ETAPES DE LA CICATRISATION .....	50
1. <i>Phase inflammatoire</i> .....	51
2. <i>Phase de réparation</i> .....	52
3. <i>Phase de remodelage</i> .....	54

B.	LES PERTES OSSEUSES DE TAILLE CRITIQUE .....	54
1.	<i>Pertes osseuses traumatiques</i> .....	54
2.	<i>Pertes osseuses non traumatiques</i> .....	55
C.	STRATEGIES ANABOLIQUES .....	55
1.	<i>Méthodes physiques</i> .....	56
2.	<i>Thérapies anaboliques présentes et futures</i> .....	57
 <b>PARTIE IV : LES CYTOKINES DE LA FAMILLE DE L'INTERLEUKINE-6 DANS LA BIOLOGIE OSSEUSE</b> .....		67
A.	LES CYTOKINES DE LA FAMILLE DE L'INTERLEUKINE 6 .....	68
1.	<i>Récepteurs</i> .....	68
2.	<i>Voies de signalisation</i> .....	70
3.	<i>Activités biologiques générales</i> .....	74
B.	ROLES SUR LA CROISSANCE ET LE REMODELAGE OSSEUX.....	78
1.	<i>Interleukine 6</i> .....	79
2.	<i>LIF</i> .....	80
3.	<i>Oncostatine M</i> .....	81
 <b>OBJECTIFS DE LA THESE</b> .....		84
 <b>RESULTATS</b> .....		87
 <b>PARTIE I : L'OSM EST PRODUIT PAR LES MONOCYTES / MACROPHAGES ACTIVES <i>IN VITRO</i> ET PARTICIPE A LA FORMATION OSSEUSE <i>IN VITRO</i> ET <i>IN VIVO</i></b> .....		88
A.	INTRODUCTION .....	89
B.	ARTICLE SCIENTIFIQUE .....	91
C.	COMPLÉMENTS DE DISCUSSION .....	107
 <b>PARTIE II : REPARATION D'UN DEFAUT OSSEUX NON-CRITIQUE CHEZ LA SOURIS OSM -/-</b> .....		111
A.	INTRODUCTION .....	112
B.	MATERIELS ET METHODES .....	115
C.	RESULTATS .....	122
D.	DISCUSSION.....	130
 <b>CONCLUSIONS GENERALES &amp; PERSPECTIVES</b> .....		135

# REMERCIEMENTS



Ce travail a été réalisé dans le Laboratoire de Physiopathologie de la Résorption Osseuse et Thérapie des Tumeurs Osseuses Primitives - INSERM UMR 957 - EA 3822, grâce à une bourse du ministère de la recherche et de l'enseignement supérieur.

Je tiens à remercier :

Frédéric Blanchard pour avoir dirigé ce travail. Je suis arrivé au labo il y a maintenant 6 ans, tu as toujours été disponible et à l'écoute. Merci pour tes nombreux conseils, ta compétence (j'ai quand même réussi à trouver UN papier que tu n'avais jamais vu !), ta patience, ton impatience (cf les lames pas encore sèches observées sous le microscope), ton enthousiasme, nos nombreuses discussions scientifiques. Tu as su m'orienter tout en me laissant de plus en plus de libertés, merci pour la confiance que tu m'as accordée. Enfin, un grand merci pour ta sympathie, ta bonne humeur et pour m'avoir permis de réaliser cette thèse dans de si bonnes conditions.

Hugues Gascan pour avoir co-dirigé ce travail. Merci pour notre enrichissante collaboration ainsi que les nombreuses aides techniques ou scientifiques.

Dominique Heymann pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire, merci pour tes nombreux conseils scientifiques, ta disponibilité et ton enthousiasme.

M. David Magne et M. Luc Malaval qui me font un grand honneur en acceptant d'être rapporteurs de ce travail.

M. Jean-Claude Lecron pour avoir accepté de juger ce travail

Pierre Layrolle pour ton aide scientifique et technique. Merci de m'avoir appris à manier la roulette de dentiste mieux que personne. Enfin un grand merci pour avoir accepté de juger ce travail.

# Liste des Abréviations

<b>ADN</b> : acide désoxyribonucléique	<b>JAKs</b> : Janus kinases
<b>ALP</b> : alkaline phosphatase	<b>LIF</b> : leukemia inhibitory factor
<b>AP1</b> : activator protein 1	<b>LIFR</b> : LIF récepteur
<b>ARN</b> : acide ribonucléique	<b>LPS</b> : lipopolysaccharide
<b>BMP</b> : Bone morphogenetic protein	<b>LRP</b> : LDL receptor-related protein 5
<b>BMU</b> : basic multicellular unit	<b>MAPK</b> : Mitogen Activated Protein Kinase
<b>BRC</b> : Bone remodeling compartment	<b>M-CSF</b> : Macrophage colony-stimulating factor
<b>BSP</b> : Sialoprotéine Osseuse	<b>MEC</b> : Matrice extracellulaire
<b>BV/TV</b> : bone volume / total volume	<b>MMP</b> : Matrix metalloproteinase
<b>C/EBP</b> : CCAAT/enhancer binding protein	<b>MSC</b> : mesenchymal stem cells
<b>CBD</b> : cytokine binding domain	<b>Néo</b> : Néomycine
<b>cbfa1</b> : core-binding factor subunit alpha-1	<b>OA</b> : ostéoarthrite
<b>CD</b> : Cluster of differentiation	<b>OC</b> : Ostéocalcine
<b>CFU-GM</b> : colony forming unit granulocyte macrophage	<b>OPG</b> : ostéoprotégérine
<b>CMH</b> : Complexe majeur d'histocompatibilité	<b>OPN</b> : Ostéopontine
<b>Coll1</b> : collagène de type 1	<b>OSM</b> : Oncostatin M
<b>Dkk1</b> : Dickkopf-related protein 1	<b>OSMR</b> : OSM récepteur
<b>DMP1</b> : dentin matrix protein 1	<b>OSX</b> : ostérix
<b>EPO</b> : érythropoïétine	<b>PBMC</b> : peripheral blood mononuclear cells
<b>FGF</b> : fibroblast growth factor	<b>PDGF</b> : platelets derived growth factor
<b>GFP</b> : green fluorescent protein	<b>PGE<sub>2</sub></b> : prostaglandin E <sub>2</sub>
<b>gp130</b> : glycoprotéine 130	<b>PI3K</b> : Phosphatidylinositol-3 kinase
<b>gpl</b> : gp130 like	<b>PKC</b> : protéine kinase C
<b>HSC</b> : hematopoietic stem cells	<b>PNN</b> : polynucléaire neutrophile
<b>IFN<math>\gamma</math></b> : interferon $\gamma$	<b>PTH</b> : hormone parathyroïdienne
<b>IGF</b> : Insulin-like growth factor	<b>RANK</b> : Receptor activator of NF $\kappa$ B
<b>IL</b> : interleukin	

**RANKL** : Receptor activator of NFκB  
ligand

**RUNX2** : Runt-related transcription factor

**S1P** : sphingosine 1 phosphate

**STAT** : Signal Transducers and Activators  
of Transcription

**Tb. N** : Trabecular Number

**Tb.Th** : Trabecular Thikness

**TGF** : Transforming growth factor

**TNF** : tumor necrosis factor

**TRAP** : tartrate resistant acid phosphatase

**VEGF** : vascular endothelial growth factor

**WT** : Wild-Type

# INTRODUCTION

# **PARTIE I : Le tissu osseux**

Le tissu osseux, tissu conjonctif spécialisé, est composé d'une fraction minérale et d'une fraction organique, lui conférant des propriétés de rigidité et d'élasticité. Ce tissu constitue ainsi la « charpente » de l'organisme et permet la protection des organes ainsi qu'un solide point d'ancrage pour le système musculaire, il exerce alors des fonctions mécaniques.

Il est également, grâce au remodelage osseux, en constant renouvellement. Cela entraîne la libération ou le stockage de sels minéraux (en particulier de Calcium et de Phosphore), permettant ainsi le contrôle du métabolisme phosphocalcique. Il exerce alors des fonctions métaboliques.

Enfin, grâce à la présence d'espaces médullaires, les os, plats principalement, renferment la moelle hématopoïétique à l'origine des cellules sanguines. Le tissu osseux exerce alors des fonctions hématopoïétiques.

Tout au long de la vie, le squelette va subir d'importants remaniements. Le remodelage osseux est un processus complexe qui permet de préserver les propriétés biomécaniques du squelette et d'adapter ce dernier aux contraintes mécaniques auxquelles il est soumis. Deux types cellulaires interviennent principalement dans ce processus : les ostéoclastes, responsables de la dégradation ou résorption osseuse, et les ostéoblastes qui permettent la production de matrice organique qui se minéralisera dans une seconde étape (apposition osseuse).

## **A. Organisation du tissu osseux**

### **1. Organisation macroscopique**

Le squelette humain contient 3 types d'os selon leur forme générale :

- les os longs (humérus, fémur, tibia) qui sont caractérisés par une partie beaucoup plus longue que les autres et qui classiquement servent de modèles pour décrire la structure des os.
- les os courts (vertèbres, phalanges) composés d'un noyau d'os spongieux entouré d'os compact.
- les os plats (sternum ou os pariétaux) qui sont composés de deux couches d'os compact, les tables interne et externe, renfermant une couche d'os spongieux.

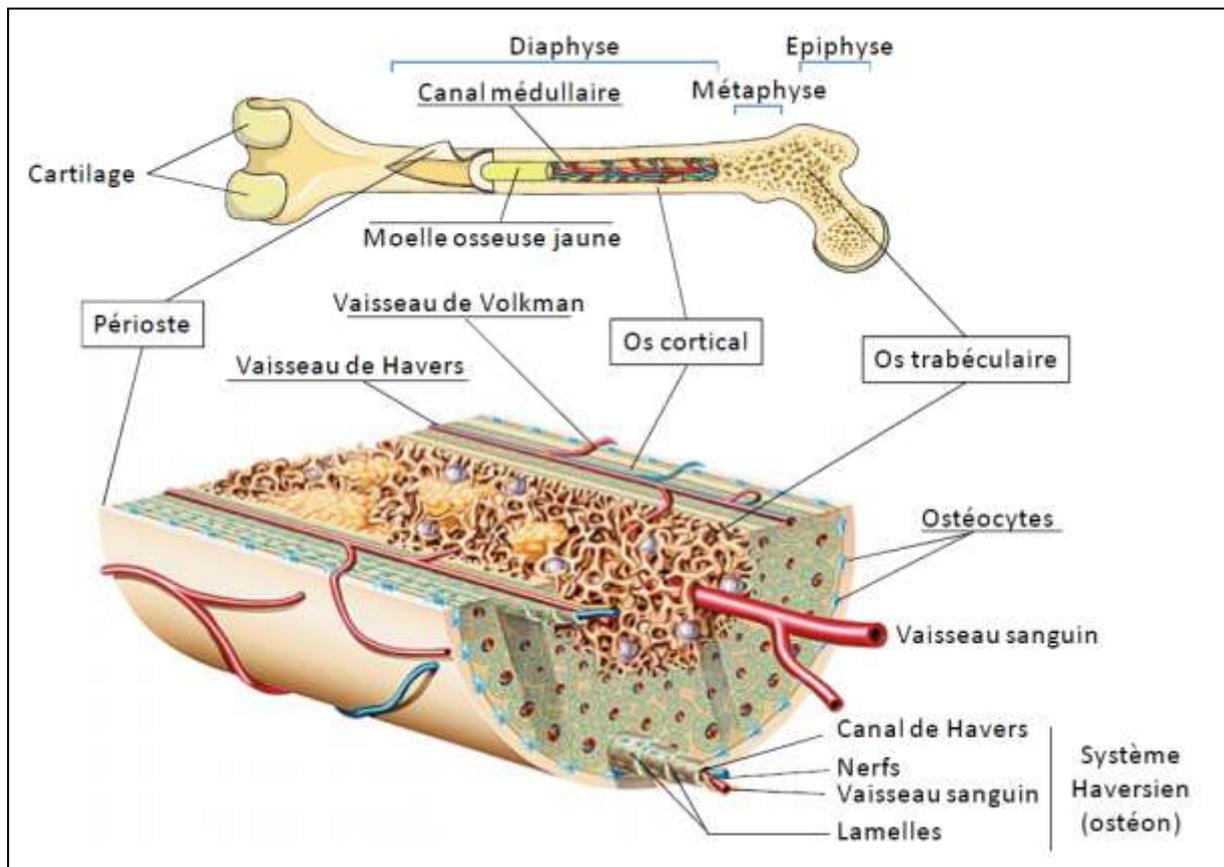


Figure 1 : Organisation structurale d'un os long (adapté du Larousse Médical)

Un os long est formé chez l'adulte de différentes parties :

- La diaphyse qui correspond à la partie centrale et cylindrique
- Les deux épiphyses qui correspondent aux deux extrémités de l'os long et qui sont recouvertes de cartilage articulaire.
- Les métaphyses faisant l'interface entre les deux épiphyses et la diaphyse.

Histologiquement, on distingue l'os cortical ou compact de l'os trabéculaire ou spongieux, l'ensemble étant entouré d'une enveloppe externe richement vascularisée, le périoste.

Cette classification en os cortical et trabéculaire est basée sur le degré de porosité du tissu :

- De 5 à 30 % pour l'os cortical (ou lamellaire ou Haversien) qui formera la « paroi » des os longs au niveau des diaphyses. Cet os est composé de systèmes de Havers. Ces systèmes (ou ostéons) sont formés : d'un canal central (le canal de Havers) contenant du tissu conjonctif vascularisé, des ostéoblastes et des

ostéoclastes ; de lamelles osseuses concentriques au canal de Havers dans et entre lesquelles se trouvent les ostéocytes.

- De 30 à 90 % pour l'os trabéculaire situé principalement au niveau des diaphyses des os longs et dans les os courts et plats. Il est constitué de lamelles osseuses ou trabécules osseuses disposées de façon non concentrique autour de cavités remplies de moelle osseuse (Figure 1).

L'ensemble de ces structures est entouré d'une « enveloppe externe », le périoste, sauf au niveau des articulations (où l'on retrouve le cartilage articulaire) et des insertions des ligaments et tendons. Très vascularisé il est composé de deux couches : périoste fibreux (externe) et périoste cellulaire (interne). Ce dernier abrite les cellules ostéoprogénitrices, ce qui permet la croissance en épaisseur de l'os (lors du développement) et l'entretien des couches sous-jacentes ainsi que la réparation en cas de fractures (après la fin de la croissance).

Au niveau de l'os cortical adjacent à la cavité médullaire, on trouve l'endoste. Qu'il soit cortical ou trabéculaire, l'endoste peut être soit en phase de quiescence, soit en phase de résorption, soit en phase de formation. Les surfaces osseuses actives sont caractérisées par la présence d'ostéoblastes actifs produisant de l'ostéoïde, c'est-à-dire un os immature partiellement minéralisé qui sera mature après un processus d'ossification secondaire. Par contre, les surfaces osseuses en phase de résorption montrent de petites zones concaves, les lacunes de Howship, sur lesquelles ou près desquelles se trouvent des ostéoclastes. Au niveau des surfaces quiescentes, on retrouve des cellules ostéoblastiques au repos, les cellules bordantes. La plupart des surfaces osseuses, chez l'homme adulte se trouvent à l'état quiescent (Figure 1) (1).

## 2. Organisation microscopique

Le tissu osseux est un tissu conjonctif constitué des cellules osseuses (les ostéoblastes, les ostéoclastes, les ostéocytes) ainsi que d'une matrice extracellulaire (MEC). Celle-ci se subdivise selon sa composition en deux phases, organique et minérale, lui conférant ses propriétés de rigidité et d'élasticité (Tableau 1).

Tableau 1 : Répartition des différents composants du tissu osseux

			Fonctions
<b>Fraction cellulaire</b> (≈5%)	Ostéoclastes		Remodelage osseux  Synthèse des protéines de la fraction organique de la MEC
	Ostéoblastes		
	Ostéocytes		
	Ostéoprogéniteurs		
<b>Matrice Extra-cellulaire</b> (≈95%)	Eau (≈10%)		
	Partie Fibrillaire (≈90%)	Collagène I	structural
		Fibronectine	adhérence cellules / matrice
		Elastine	structural
	Partie inter fibrillaire (≈10%)	protéoglycanes	diffusion des nutriments
		glycosaminoglycanes	
		glycoprotéines	
		ostéocalcine	minéralisation
		ostéopontine	adhérence
		sialo-protéines osseuses	minéralisation
	Fraction minérale (≈65%)	hydroxyapatites	
Ions			

## 21. La matrice extracellulaire

### 211. *Fraction organique*

Elle est composée par une partie fibrillaire formée majoritairement de collagène de type I (environ 90 %) qui est composé d'un assemblage de trois chaînes alpha de polypeptides et est synthétisée par les ostéoblastes. Dans le tissu osseux lamellaire, ces fibres de collagène sont arrangées de façon parallèle au sein d'une même lamelle osseuse, mais leur orientation peut varier d'une lamelle à l'autre. La partie fibrillaire est également composée d'élastine (rôle structural avec le collagène I) et de fibronectine (rôle d'organisation de la MEC et d'adhésion cellulaire).

La MEC est également composée de la substance interfibrillaire (ou substance non-collagénique) qui est formée de glycosaminoglycanes, de protéoglycanes et de glycoprotéines. On retrouve ensuite différentes protéines non-collagéniques. La plus abondante (10 à 20 %) est l'ostéocalcine (OC); sécrétée par les ostéoblastes, cette protéine est impliquée dans les processus de minéralisation et la régulation de l'homéostasie calcique (2). L'ostéopontine (OPN) est une protéine d'adhérence du tissu osseux reliant l'hydroxyapatite aux cellules osseuses. La sialoprotéine osseuse (BSP) est impliquée dans la minéralisation initiale de l'os

en se déposant sur la MEC et facilitant la formation des cristaux d'hydroxyapatite. Des facteurs de croissance et des cytokines (transforming growth factor ou TGF, insulin-like growth factor ou IGF, des interleukines ou IL et des bone morphogenetic proteins ou BMP) sont également présents en petites quantités dans la matrice osseuse. Ces facteurs protéiques jouent un rôle important dans l'activation et la différenciation cellulaire et interviennent dans le couplage entre formation et résorption osseuse.

### *212. Fraction minérale*

La phase minérale qui constitue environ 65% de la matrice osseuse confère à l'os sa rigidité, sa résistance mécanique et représente la plus importante réserve minérale de l'organisme. En effet, environ 99% du calcium de l'organisme, 85% du phosphore et entre 40 et 60% du sodium et du magnésium sont incorporés dans les cristaux qui constituent la substance minérale osseuse, ces minéraux sont ensuite rapidement mobilisables grâce au mécanisme de remodelage osseux. Elle est essentiellement composée de phosphate de calcium sous forme de cristaux d'hydroxyapatite ( $\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) disposés dans les espaces interfibrillaires. Leur nombre et leur taille s'accroissent lentement au cours du processus de minéralisation qui commence par la synthèse de la matrice ostéoïde par les ostéoblastes (essentiellement sous forme de collagène I). Puis, via l'OC et l'activité phosphatase alcaline des ostéoblastes, les taux de calcium et d'hydroxyde de phosphate augmentent et la trame collagénique est progressivement minéralisée.

## 22. Les cellules de la lignée mésenchymateuse

### *221. Les cellules souches mésenchymateuses*

Les MSC (Mesenchymal Stem Cells) de la moelle osseuse ont été identifiées par Alexandre Friedenstein qui décrit, dans les années 1980, des cellules immatures de la moelle osseuse de souris capables de développer, après implantation sous la capsule rénale, du tissu fibreux, de l'os, et de la moelle osseuse (3)(Figure 2).

#### *2211. Critères de sélection*

Les MSC ont été identifiées et isolées principalement dans la moelle osseuse mais on les retrouve également dans le tissu adipeux, le placenta ou le sang de cordon ombilical. Ces

cellules sont capables de remplacer localement des cellules âgées ou lésées (4). Selon la société internationale de cytothérapie (5), pour être considérée comme MSC une population cellulaire doit posséder différentes caractéristiques :

- Adhérer au plastique dans des conditions de culture « standards »
- Exprimer les marqueurs CD105, CD90 et CD73.
- Ne pas exprimer les marqueurs CD45, CD34, CD14 (ou CD11b), CD79a (ou CD19), et le CMH de classe II (6).
- Pouvoir se différencier en ostéoblastes, chondrocytes ou adipocytes (7) .
- Avoir des propriétés immunorégulatrices via l'inhibition de la prolifération des lymphocytes T (8).

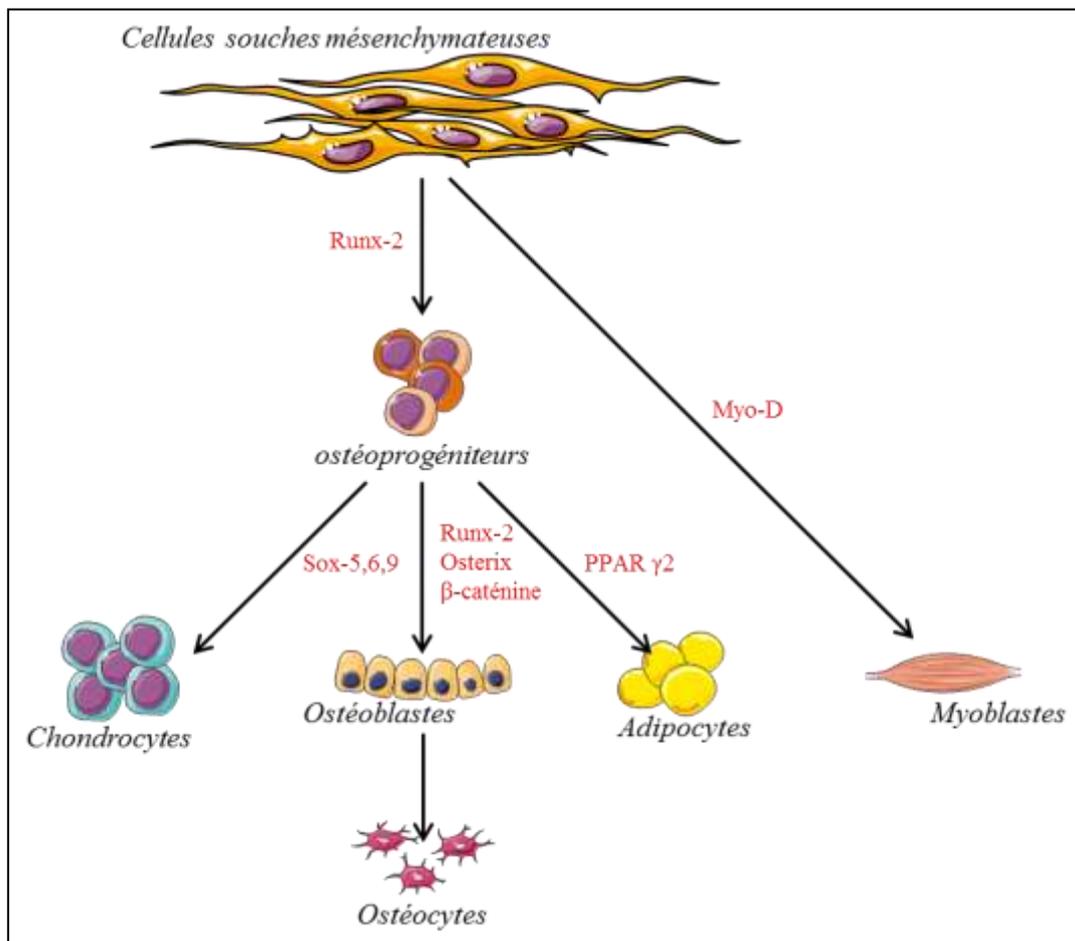


Figure 2 : Différenciation des MSC et facteurs de transcription impliqués

Les MSC pouvant être cultivées ex-vivo et se différencier en différents types cellulaires grâce à des conditions de cultures particulières, cela les place comme bon candidat dans

certaines applications thérapeutiques comme la régénération tissulaire ou des thérapies anti-inflammatoires par exemple en rhumatologie.

### *2212. Rôle des MSC dans l'hématopoïèse*

Leurs propriétés immunorégulatrices ainsi que leur localisation préférentielle dans la moelle osseuse suggèrent un lien intime entre les MSC et le système immunitaire. En effet, un nombre croissant de publications fait état de l'implication des MSC dans la mise en place des niches hématopoïétiques en site osseux (9).

De plus, l'étude de Friedenstein et collaborateur (10) dès 1982 a pu montrer que la transplantation de MSC issues de la moelle osseuse sous la capsule rénale entraînait l'apparition d'éléments supportant la niche hématopoïétique tels que des ostéoblastes ou des fibroblastes (11). En effet, *in vitro* les MSC produisent de nombreux facteurs stimulant la survie des cellules souches hématopoïétiques ainsi que leur maintien à l'état souche (12). *In vivo*, la déplétion des MSC de la moelle osseuse entraîne une augmentation du recrutement des cellules souches hématopoïétiques dans la circulation sanguine (13).

### *222. Les chondrocytes*

Les chondrocytes dérivent des MSC qui se différencient sous l'influence notamment du facteur de transcription SOX-9. On distingue différents stades de maturation pour le chondrocyte : le chondroblaste, le chondrocyte mature puis le chondrocyte hypertrophique. A eux seuls, les chondrocytes forment le tissu cartilagineux, tissu dépourvu de vaisseaux sanguins, lymphatiques et de nerfs. Le cartilage étant un tissu non vascularisé, la nutrition des chondrocytes s'effectue à partir du périchondre ou à partir du liquide synovial et de l'os sous-chondral (pour les cartilages articulaires), par diffusion ou via des canaux cartilagineux.

### *223. La lignée ostéoblastique*

Les ostéoblastes sont les cellules responsables de la synthèse de la matrice organique osseuse ainsi que de sa minéralisation. Ces cellules ont une origine mésodermique et, comme les chondrocytes, elles dérivent de MSC. Chez l'adulte, on les retrouve essentiellement au niveau du stroma médullaire, du périoste et de l'endoste. La maturation des ostéoblastes se déroule via une série d'étapes complexes de prolifération puis de différenciation de la MSC vers l'ostéoblaste mature et ceci implique de nombreux facteurs de transcription (Figure 3).

### 2231. Facteurs de transcription impliqués dans l'ostéoblastogenèse

Le point de départ de l'ostéoblastogenèse est l'expression de facteurs de transcription par les MSC, notamment Runx2 (pour Runt-related transcription factor 2) (ou cbfa-1 pour core-binding factor subunit alpha-1). Ce facteur de transcription en se liant au promoteur de nombreux gènes impliqués dans l'ostéoblastogenèse (dont le *COLLI*, la *BSP*, l'*OC* ou l'*OPN*) va initier la différenciation des MSC vers le pré-ostéoblaste. Chez la souris, la délétion génique de ce gène entraîne une absence totale de tissu osseux bien que les maquettes cartilagineuses soient présentes (14).

Le facteur de transcription Ostérix (*Osx*) est également impliqué dans la différenciation ostéoblastique et donc dans la formation osseuse. En effet, les souris déficientes pour *Osx* ne possèdent pas d'ostéoblastes, ce qui se traduit par une absence de formation osseuse (15). De plus, le fait que *Runx2* soit correctement exprimé chez ces souris indique qu'*Osx* intervient en aval de *Runx2* (16). Il a été montré que *Runx2* stimule l'expression d'*Osx* qui favorise le passage du stade pré-ostéoblaste vers l'ostéoblaste mature et fonctionnel en activant notamment le promoteur de *COLLIA1* (17).

Le facteur AP1 (activator protein 1) (composé d'hétérodimères de protéines des familles Fos et Jun) est également un important régulateur de la formation osseuse. Dans les ostéoblastes, ce facteur est induit par le TGF- $\beta$ , la parathormone (PTH) et la Vitamine D3. Différentes formes du facteur AP1 vont être exprimées au cours de l'ostéoblastogenèse, dans les stades précoces toutes les protéines des familles Fos et Jun sont exprimées puis, déclinent avec la différenciation. Enfin le facteur AP1 des ostéoblastes matures n'est composé que de Fra-2 et JunD (18).

Un autre facteur de transcription, Dlx-5, joue un rôle essentiel. En effet, l'inactivation du gène de *Dlx-5* chez la souris induit un retard d'ossification, sans altérer la morphogenèse (19). Sa fonction pourrait être de contrôler l'expression de la sialoprotéine osseuse et de l'ostéocalcine en interférant avec un autre facteur, Msx2. La sur-expression de *Msx2* accélère l'ossification membranaire alors que son inactivation retarde la différenciation ostéoblastique, suggérant que *Msx2* est un régulateur positif de l'ostéogenèse (20).

Les C/EBPs (CCAAT/enhancer-binding proteins) sont des facteurs de transcription importants dans les différenciations adipocytaires et ostéoblastiques. Par exemple, *C/EBP $\delta$*  et *C/EBP $\beta$*  contrôlent l'expression de l'*OC* (21) et des souris déficientes pour une des *C/EBP* souffrent de sévère ostéopénie (22).

L'expression de ces différents facteurs de transcription est sous le contrôle de cytokines ou d'hormones comme les BMPs, le TGF- $\beta$ , Wnt, hedgehog, les FGFs (Fibroblast Growth Factor), les œstrogènes ou les androgènes (23). Ainsi, la BMP2 en activant Smad1/5 et Smad4 stimule l'expression et la fonction de Runx2. Les protéines anaboliques Wnt (Wnt3a et Wnt10), en activant la voie Wnt/ $\beta$ -Catenin, augmentent également l'expression de Runx2 (24)(25). Enfin certaines cytokines de la famille de l'IL-6, via l'activation du facteur de transcription STAT3 (Signal Transducers and Activators of Transcription) (26), stimulent l'expression de Runx2 et de C/EBP (Figure 3).

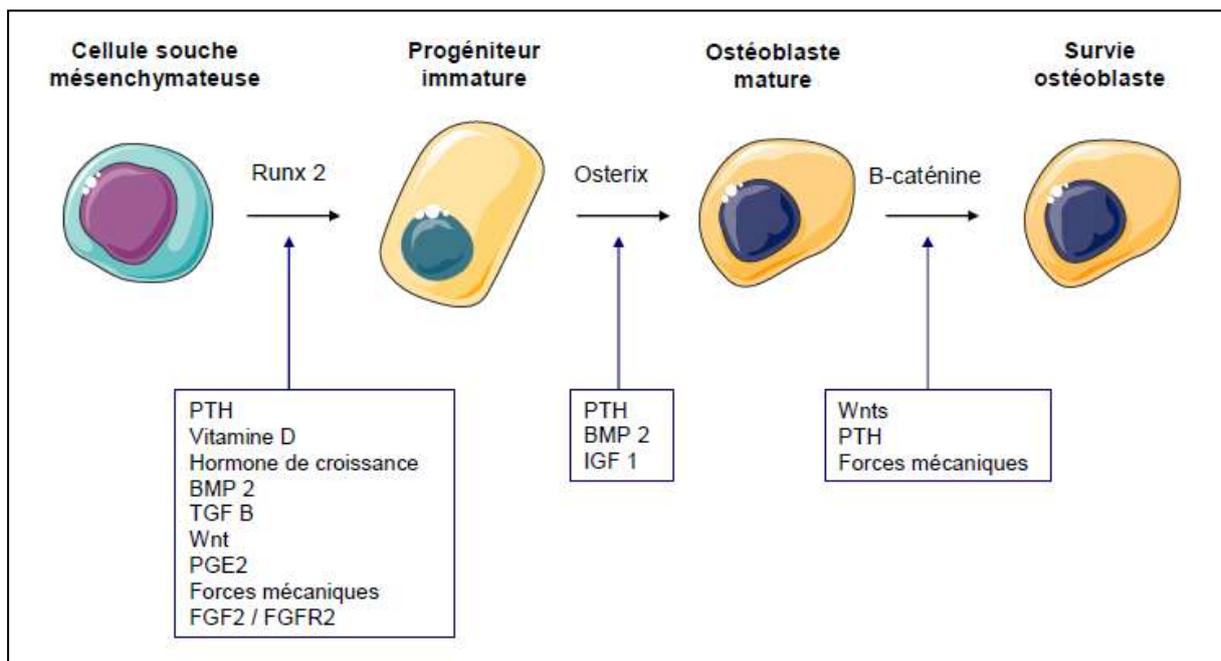


Figure 3 : Régulation des facteurs de transcription de la voie ostéoblastique. Adapté de (23)

## 2232. Les différentes cellules de la lignée ostéoblastique

### 22321. Le pré-ostéoblaste

Les pré-ostéoblastes dérivent directement des MSC, ils se localisent généralement à proximité des lieux de formation osseuse, près des ostéoblastes matures. Ces cellules allongées ont la capacité de se diviser mais ne synthétisent pas de matrice extracellulaire. Elles commencent à exprimer quelques marqueurs précoces comme l'OPN ou le Coll1 (27).



Figure 4 : Ostéoblastes en microscopie optique. D'après (28)

### 22322. L'ostéoblaste

Les ostéoblastes matures (Figure 4) font suite aux préostéoblastes et sont capables de synthétiser la matrice extracellulaire puis de la minéraliser. Ce phénomène a lieu lors de la croissance puis à l'âge adulte au cours du remodelage osseux. Ces cellules qui ne se divisent plus ont un cytoplasme basophile, renferment un abondant réticulum endoplasmique granulaire, de nombreuses mitochondries et un appareil de Golgi très développé, démontrant une activité de synthèse protéique très importante. Ils reposent sur un tissu non minéralisé, la couche ostéoïde formée majoritairement de collagène, de protéoglycanes et de glycosaminoglycanes. Les ostéoblastes une fois matures expriment alors de nombreux marqueurs :

- La phosphatase alcaline (ALP), enzyme responsable de l'hydrolyse des pyrophosphates inorganiques qui inhibent la calcification et qui donc participe à la minéralisation de la matrice extracellulaire (29).
- Le Coll1, protéine formant environ 90% de la matrice extracellulaire du tissu osseux. Formée d'une triple hélice de chaînes polypeptidiques, il est produit par le réticulum endoplasmique puis secrété dans la matrice extracellulaire.
- La sialoprotéine osseuse (BSP) et l'OPN sont les deux protéines non collagéniques les plus exprimées dans le tissu osseux et appartenant à la famille des SIBLINGs (Small Integrin-Binding Ligand N-linked Glycoprotein). Ces protéines adhésives en se fixant à des récepteurs membranaires de type intégrine permettent l'adhésion des cellules à la matrice osseuse (30).
- l'ostéocalcine, protéine spécifique du tissu osseux. Elle y est exprimée en grande quantité, représentant 10 à 20 % des protéines non collagéniques de l'os. Elle

contient des résidus acides carboxyglutamiques (gla) dont la carboxylation est dépendante de la vitamine K. Cette protéine, exprimée tardivement par l'ostéoblaste mature, semble jouer un rôle clé dans la résorption osseuse en stimulant la différenciation ostéoclastique (31).

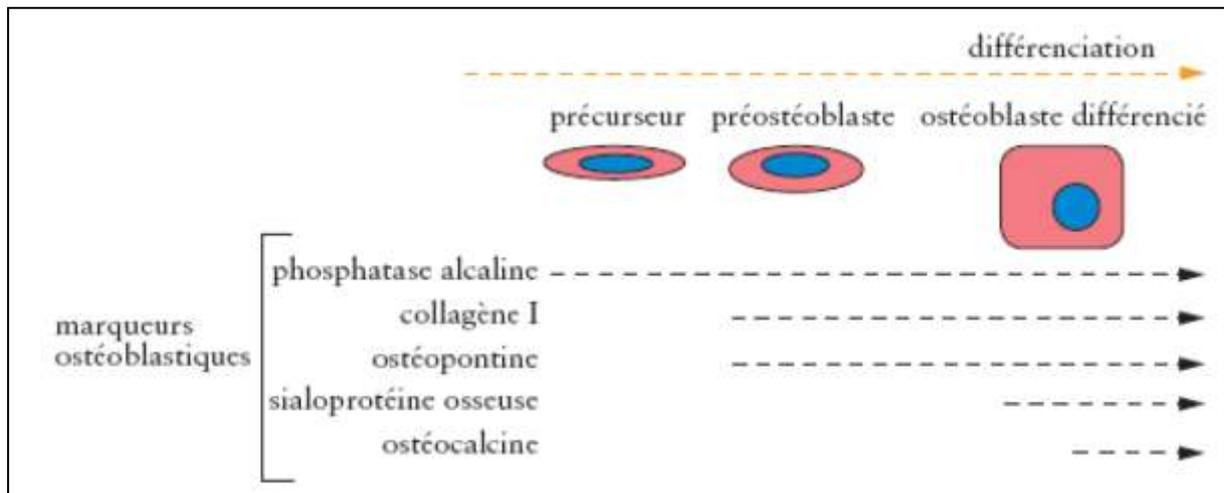


Figure 5 : Les principaux marqueurs exprimés au cours de la différenciation ostéoblastique

Il existe néanmoins une très grande hétérogénéité dans l'expression de ces marqueurs ostéoblastiques. Candelière et collaborateurs (32) ont en effet montré que des ostéoblastes histologiquement identiques mais issus de différentes zones de la calvaria de rat expriment en fait des marqueurs à des taux très variables. Seule la phosphatase alcaline semble exprimée de façon ubiquitaire. En revanche, les niveaux d'expression de la sialoprotéine osseuse ou de l'ostéocalcine sont très différents en fonction de la localisation et de l'environnement osseux (Figure 5).

En dehors des protéines osseuses, les ostéoblastes sécrètent un certain nombre de facteurs de croissance qui jouent un rôle important dans la régulation du métabolisme osseux, tels que le TGF $\beta$ , les FGFs et les BMPs.

- Le TGF $\beta$  est un facteur local fondamental dans le contrôle de l'ostéogenèse. Il est produit sous forme latente par les ostéoblastes, puis stocké dans la matrice osseuse en association avec une protéine porteuse, l'ensemble étant libéré lors de la résorption osseuse par les ostéoclastes. In vitro, le TGF $\beta$  stimule la prolifération des préostéoblastes ainsi que la production de collagène de type I et de l'ostéopontine (33) (34).

- Les BMPs (BMP-2, -4, -6, 7), membres de la super famille du TGF $\beta$ , sont produites par les ostéoblastes et jouent un rôle fondamental dans le contrôle de la formation osseuse. Les BMPs agissent à plusieurs niveaux, en augmentant l'expression de Runx2 dans les précurseurs ostéoblastiques et en stimulant l'expression des gènes ostéoblastiques (phosphatase alcaline, collagène de type I, ostéocalcine) dans les ostéoblastes (35) (34).
- Les FGFs sont des régulateurs importants de la prolifération, de la fonction et de l'apoptose des ostéoblastes (36). In vivo, les FGF-1 et FGF-2 (ou bFGF) stimulent la formation osseuse de l'endoste et du périoste chez le rat. Inversement, l'inactivation du gène FGF-2 chez la souris diminue la formation osseuse et induit une ostéopénie (37). Bien que le FGF-2 module l'expression des gènes ostéoblastiques, une partie de ces effets anaboliques sont indirects, induits par une stimulation de la production de TGF $\beta$  par les ostéoblastes.

Les ostéoblastes produisent également des molécules régulatrices solubles comme des cytokines (Interleukine-6, Interleukine-11, TNF $\alpha$ ), RANKL (Receptor Activator of Nuclear Factor  $\kappa$ B Ligand) ou OPG (Ostéoprotégérine), relarguées dans le milieu extracellulaire ou exprimées à la surface de l'ostéoblaste et agissant sur les cellules précurseurs des ostéoclastes (38). Certaines protéases, capables de réguler le remodelage osseux par leur action sur les protéines de la matrice osseuse, sont également produites par les ostéoblastes. C'est le cas des MMPs (matrix metalloproteinases), dont la MMP13 ou collagénase 3 (39).

A l'issue de la période de formation osseuse, la majorité des ostéoblastes meurt par apoptose, un processus de mort cellulaire programmée commun à de nombreux tissus. Les cellules restantes peuvent alors se transformer en cellules bordantes ou en ostéocytes (40) (Figure 6).

### 22323. *La cellule bordante*

Les cellules bordantes sont des ostéoblastes inactivés, ou quiescents, et forment une monocouche de cellules aplaties ou fusiformes contenant peu de cytoplasme et peu d'organites ce qui traduit une activité de synthèse réduite. Leur principale fonction est d'assurer la communication entre l'environnement cellulaire et les ostéocytes emmurés dans la matrice osseuse. Elles jouent également un rôle durant la phase initiale du remodelage osseux. En effet, elles sont capables de percevoir un signal d'initiation dont la nature reste

inconnue, conduisant à la dégradation de la matrice organique non minéralisée située sous ces cellules. La matrice minéralisée est alors exposée à l'action des précurseurs ostéoclastiques qui vont migrer, fusionner et adhérer à la matrice (41,42) (Figure 6).

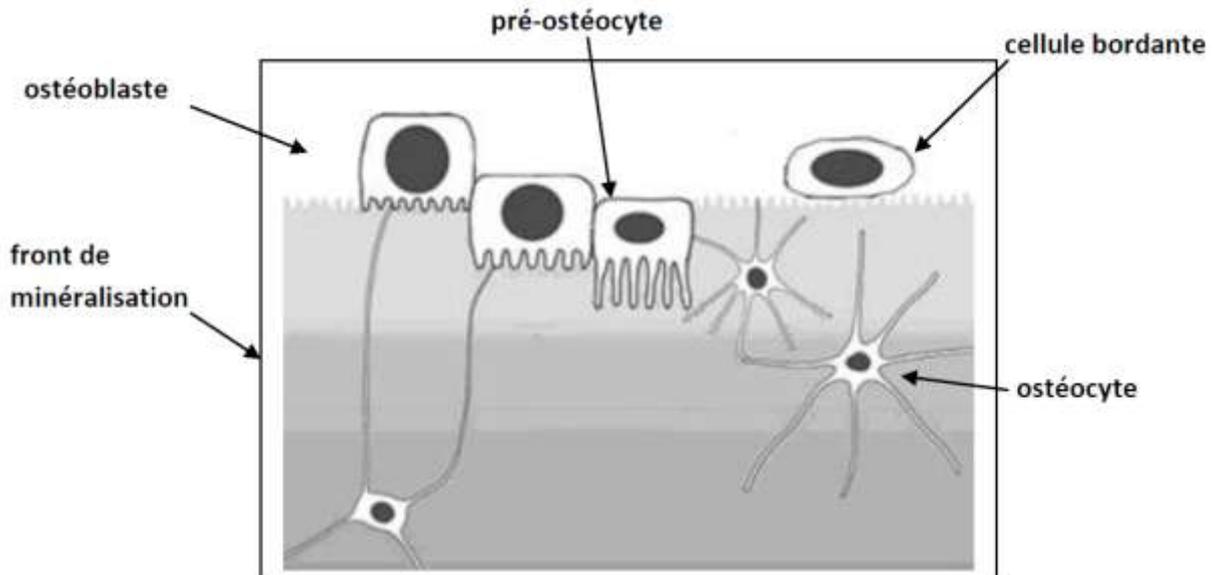


Figure 6 : Ostéoblastes, ostéocytes et cellules bordantes. D'après (27)

#### 22324. L'ostéocyte

Les ostéocytes proviennent d'ostéoblastes enfouis dans la matrice osseuse minéralisée, à l'intérieur d'une lacune périostéocytaire ou ostéoplaste. Ce sont les cellules les plus abondantes de l'os mature. En se différenciant en ostéocyte le volume cytoplasmique de l'ostéoblaste est réduit de 70% alors que de nombreux et fins prolongements cytoplasmiques sont formés (43), leur conférant une forme étoilée (Figure 7).

Le cytoplasme des ostéocytes renferme un abondant cytosquelette, composé de microtubules, de filaments intermédiaires et de filaments d'actine. En revanche, les organites intracellulaires sont peu développés, ceci indiquant une très faible activité de synthèse protéique. Les marqueurs ostéoblastiques précédemment exprimés vont progressivement disparaître (ALP, coll1, BSP, OC) lors de la différenciation terminale en ostéocyte (27,44).



Figure 7 : Ostéocyte dans son ostéoplaste colorisé en microscopie électronique à balayage (x4000)

Sous l'action notamment de la MMP-2, de la DMP1 (Dentin Matrix Protein-1) (45) ou de cytokines comme l'OSM (Oncostatin M) (46), les ostéoblastes vont se différencier en ostéocytes et s'enfouir dans la matrice osseuse tout en gardant de nombreux et fins prolongements cytoplasmiques qui leur permettent d'établir des contacts avec les autres ostéocytes et les cellules bordantes qui recouvrent la surface osseuse. Les substances nutritives qui proviennent du sang atteignent les ostéocytes en diffusant soit dans les canalicules autour des prolongements cellulaires, soit dans les cellules elles-mêmes, passant de l'une à l'autre par des jonctions communicantes (jonctions GAP) (47). Ce mode de diffusion, peu efficace, impose aux ostéocytes de se trouver à moins de 0,2 mm d'un vaisseau sanguin. Cette limitation explique la taille des travées de l'os spongieux et la structure de base de l'os compact : l'os haversien.

Les ostéocytes en formant un vaste réseau ont pour fonction première de transmettre des signaux mécanosensoriels durant le processus de remodelage osseux. En effet, ces cellules interagissent avec les fibres de collagènes tapissant les ostéoplastes par l'intermédiaire de molécules de type intégrines et fonctionnent comme des mécanorécepteurs, percevant les modulations des contraintes mécaniques appliquées à l'os. Ils transmettent ensuite les informations aux ostéoblastes et aux cellules bordantes par l'intermédiaire des jonctions communicantes assurant une adaptation fonctionnelle du tissu osseux (48,49).

Les ostéocytes régulent également la formation osseuse par la sécrétion de sclérostine qui est un de leurs marqueurs spécifiques. La sclérostine est un antagoniste des voies Wnt et

contrôle négativement l'activité des ostéoblastes (50). Bien que les mécanismes de régulation soient à ce jour inconnus, il semblerait que l'apoptose de ces cellules soit le facteur déclenchant l'ancrage des ostéoclastes à la surface osseuse et par conséquent la mise en place du processus de résorption (45).

## 23. Les ostéoclastes

Les ostéoclastes sont les seules cellules de l'organisme capables de résorber l'os. Ils sont capables de dégrader, au niveau de la chambre de résorption, la phase organique par la sécrétion d'enzymes et, la phase minérale en diminuant le pH. Ils jouent un rôle critique dans le développement et le maintien du squelette et sont également impliqués dans de nombreuses pathologies osseuses telles que l'ostéoporose, les ostéolyses tumorales ou les rhumatismes inflammatoires. Cette grosse cellule multinucléée pouvant renfermer de 2 à 30 noyaux possède un appareil de golgi très développé, de nombreuses mitochondries péri-nucléaires et est riche en enzymes lysosomales telles que TRAP (Tartrate Resistant Acide Phosphatase) ou la cathepsine K et en collagénases nécessaires à son activité de dégradation osseuse (51). Ces cellules sont visibles au fond des lacunes de résorption appelées lacunes de Howship, au contact de la matrice osseuse calcifiée. Une des caractéristiques propres à l'ostéoclaste actif est sa bordure en brosse constituée d'une succession d'expansions et d'invaginations de la membrane cytoplasmique apicale adjacente à la surface osseuse (Figure 8) (52).



Figure 8 : Ostéoclaste et lacune de Howship en microscopie électronique à balayage (colorisé)

## 231. Origine et différenciation

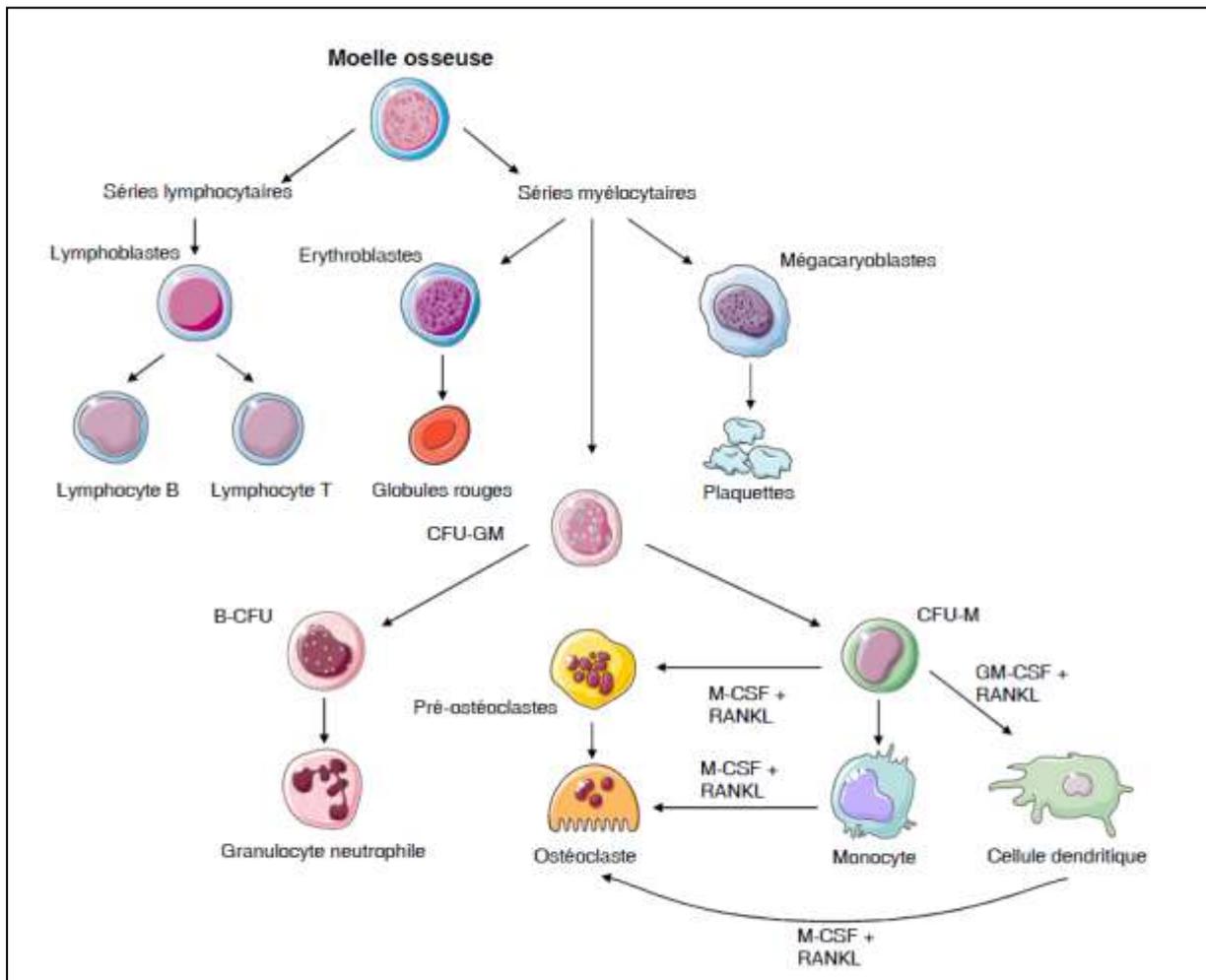


Figure 9 : Voie de différenciation des ostéoclastes. D'après (53)

Les cellules souches hématopoïétiques (HSC) sont à l'origine des ostéoclastes (52,54). Ces dernières donnent naissance aux cellules mononucléées appelées CFU-GM (Colony Forming Unit Granulocyte- Macrophage). Le M-CSF (Macrophage-Colony Stimulating Factor) stimule la prolifération de ces CFU-GM afin de maintenir un pool de cellules mononucléées appartenant à la lignée monocyte / macrophage. Une faible proportion de ces cellules est considérée comme précurseurs des ostéoclastes et est caractérisée par l'absence de deux marqueurs ostéoclastiques : TRAP et CTR (récepteurs à la calcitonine ; inhibiteur de la résorption). Les précurseurs mononucléés sont attirés vers un site de résorption, par chimiotactisme, puis se fixent à la matrice osseuse pour se différencier, sous l'action de M-CSF et RANKL, en ostéoclastes mononucléés exprimant le CTR et TRAP. Ces cellules, toujours sous l'effet de M-CSF et RANKL, fusionnent pour former des cellules multinucléées

qui ne sont pas encore actives et ne développent pas de bordure en brosse. L'activation des ostéoclastes est due à RANKL qui va stimuler la formation de la bordure en brosse (55,56).

Parmi les PBMCs (Peripheral Blood Mononuclear Cells), seules certaines fractions monocytaires sont capables de se différencier en ostéoclastes matures en présence de M-CSF et de RANKL. La population la plus utilisée actuellement en tant que modèle d'ostéoclastogénèse est la population monocytaire exprimant le marqueur CD14 (un co-récepteur aux lipopolysaccharides, LPS) (57–59). Les ostéoclastes peuvent également dériver de cellules engagées dans un autre processus de différenciation. En effet, les cellules dendritiques immatures sont également capables de se différencier en ostéoclastes fonctionnels sous l'action de M-CSF et de RANKL (53,60,61) (Figure 9).

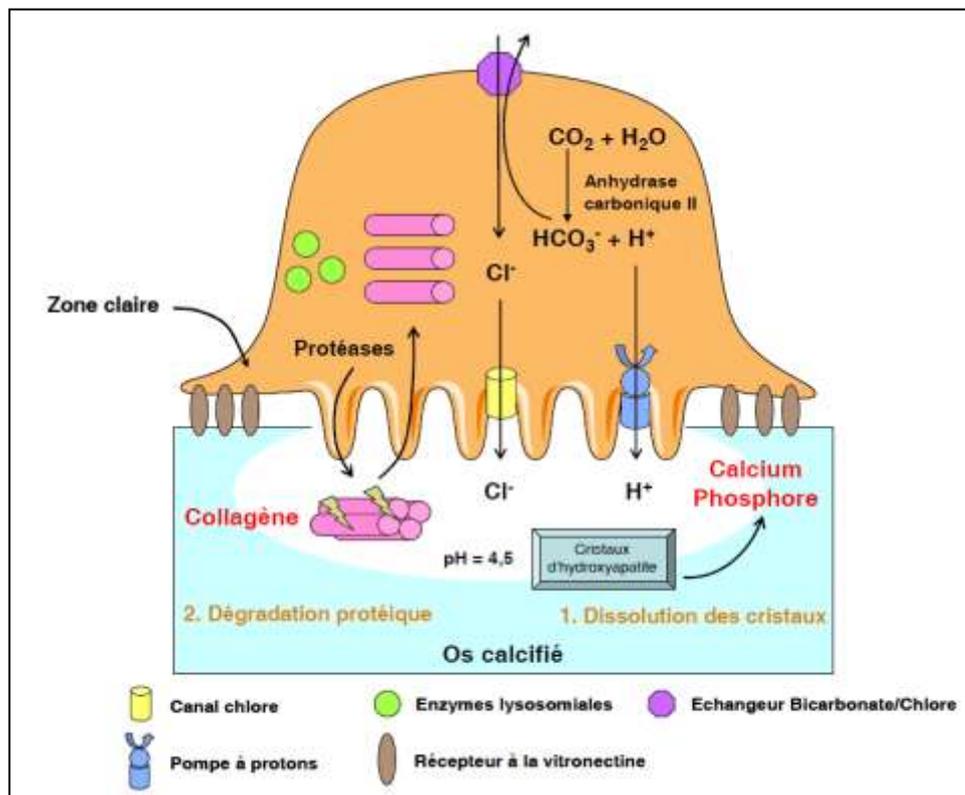


Figure 10 : Schéma d'un ostéoclaste actif (d'après (51))

Par ailleurs, l'équipe de Lin et collaborateurs a découvert une nouvelle cytokine, l'IL-34. Ils ont démontré que cette dernière partageait son récepteur avec le M-CSF ; c-fms ou CSF-1 receptor exprimé à la surface des monocytes (62). L'IL-34 peut d'ailleurs se substituer au M-CSF pour stimuler l'ostéoclastogénèse dans un contexte physiologique et pathologique (63–65).

### 232. *Fonction des ostéoclastes*

La fonction essentielle des ostéoclastes est la résorption osseuse. Durant la première phase de ce processus, une réorganisation du cytosquelette des ostéoclastes est observée : les microfilaments d'actine, de vinculine et de taline s'organisent en anneaux. Ce phénomène est indispensable à la formation de la zone claire, zone dépourvue d'organites intracellulaires et riche en filaments d'actine (66). Elle correspond à une région où la membrane plasmique est en contact avec l'os délimitant ainsi un compartiment clos entre la bordure en brosse et la surface osseuse. Le processus de résorption est réalisé dans ce compartiment appelé chambre de résorption (67) et s'effectue en deux étapes : la dissolution de la matrice minérale précède la dégradation de la phase organique. Ainsi, l'acidification de la chambre de résorption (pH = 4,5) permet la déminéralisation de la matrice. Ce processus fait intervenir des pompes à protons ATP dépendantes. Le pH à l'intérieur de l'ostéoclaste est maintenu par un transport passif de  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ . Enfin, l'électroneutralité est assurée par un canal chlore. La digestion de la trame organique s'effectue sous l'action des enzymes protéolytiques (cathepsine K, collagénases ou métalloprotéases) contenues dans les lysosomes (51,68) (Figure 10).

### 233. *La triade RANK/RANKL/OPG*

La triade RANK/RANKL/OPG, médiateur de la communication intercellulaire entre ostéoblastes et ostéoclastes, exerce un rôle fondamental dans le contrôle de l'ostéoclastogenèse. RANKL est une cytokine transmembranaire pouvant être clivée par des protéases de manière à générer une forme soluble. RANKL se lie avec une forte affinité à son récepteur RANK exprimé à la surface des ostéoclastes. L'interaction RANK/RANKL est essentielle à la différenciation et à la survie des ostéoclastes par l'activation de différentes voies de signalisation. Chez les souris invalidées pour les gènes RANKL ou RANK, l'activation des ostéoclastes est déficiente, entraînant une ostéopétrose (69).

L'OPG est une glycoprotéine soluble, produite notamment par les ostéoblastes, qui agit comme un récepteur leurre de RANKL. Le ratio entre le niveau d'expression de RANKL et d'OPG par les ostéoblastes permet donc le contrôle de la résorption osseuse. En effet, il a été montré que la délétion génique d'OPG entraînait une ostéoporose sévère caractérisée par une résorption excessive (70), alors qu'une surexpression d'OPG entraîne une ostéopétrose (71). Différents facteurs sont capables de réguler l'homéostasie du tissu osseux en agissant sur la triade RANK/RANKL/OPG (69,72,73).

- Runx2 régule directement l'expression des gènes de RANKL et de l'OPG dans les ostéoblastes, constituant ainsi un lien moléculaire entre formation et résorption osseuse.
- La PTH inhibe la sécrétion de l'OPG et active l'expression de RANKL par les ostéoblastes (73)
- L'IL-1 $\beta$  et le TNF $\alpha$  stimulent la synthèse de M-CSF et de RANKL par les précurseurs ostéoblastiques.
- L'IL-6 et les glucocorticoïdes stimulent également l'expression de RANKL
- La vitamine D à dose physiologique, inhibe la stimulation de l'expression de RANKL par la PTH
- Le TGF $\beta$ , les oestrogènes et les BMPs augmentent l'expression de l'OPG. La chute du taux d'oestrogènes lors de la ménopause favorise de ce fait le développement de l'ostéoporose.

Cette triade moléculaire contribue au bon déroulement du remodelage osseux. Tout dérèglement de cet équilibre entre les phases d'apposition et de résorption osseuse est susceptible d'induire l'apparition de pathologies ostéocondensantes ou ostéolytiques. Des modifications du ratio RANKL / OPG ont notamment été décrites dans des pathologies d'origine tumorale associées à un fort remodelage osseux (Figure 11).

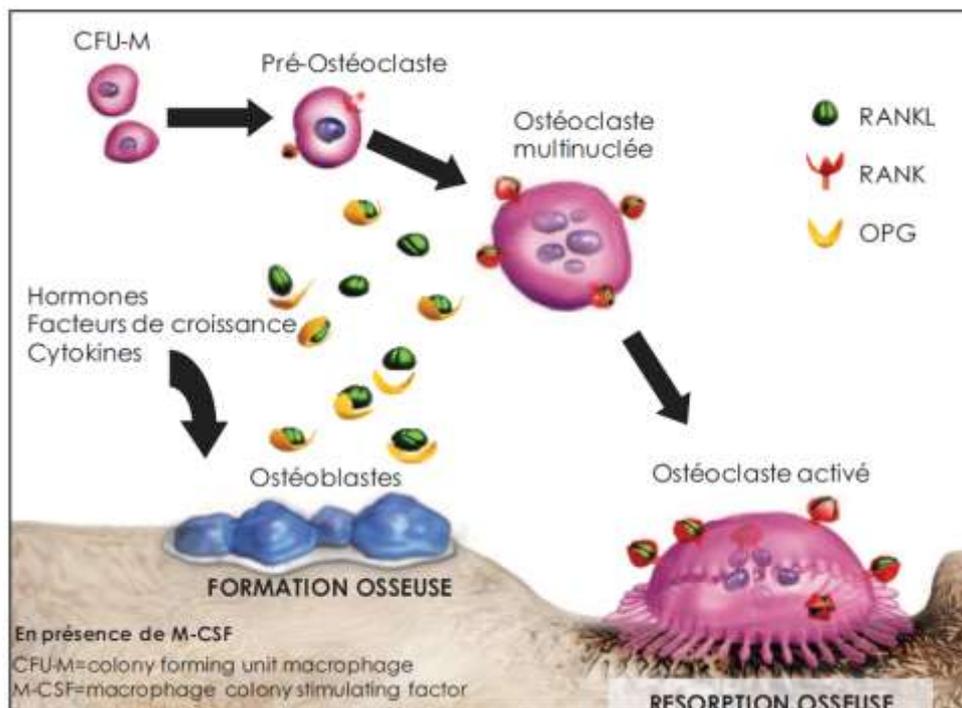


Figure 11 : Rôle de la triade OPG / RANK / RANKL dans la différenciation ostéoclastique (d'après Amgen®, adapté de (72))

## **B. Croissance osseuse**

L'ostéogenèse est un processus de métaplasie au cours duquel un tissu conjonctif est transformé en tissu osseux. Cela fait intervenir deux phases, l'ossification primaire puis secondaire.

### **1. Ossification primaire**

L'ossification primaire correspond à la formation d'un tissu osseux sur un support non osseux. Elle débute durant la vie embryonnaire ou fœtale, à des moments variables suivant les pièces osseuses. La formation de l'os débute à partir d'un tissu conjonctif ou d'un support cartilagineux hyalin :

- La formation endoconjonctive correspond soit à l'ossification périostique pour la diaphyse des os longs, soit à l'ossification membranaire pour les os plats,
- La formation sur un support cartilagineux est nommée ossification endochondrale ou enchondrale, comme au niveau de la diaphyse des os longs, des épiphyses des os longs ou des os courts.

### **11. Ossification membranaire**

L'ossification membranaire a lieu lors du développement des os plats. Le tissu osseux se développe directement par différenciation du tissu mésenchymateux embryonnaire. Le processus d'ossification débute avec l'arrivée de la vascularisation. Au niveau d'une zone vascularisée du tissu conjonctif embryonnaire, des MSC prolifèrent et se différencient directement en pré-ostéoblastes puis en ostéoblastes. Ces cellules élaborent la matrice ostéoïde sur un support de fibres de collagène de type I, qui se minéralise dans un second temps. L'ossification progresse de proche en proche en formant un réseau de travées osseuses dans l'os spongieux. L'os formé au niveau de ces sites d'ossification est de l'os fibreux qui sera ensuite résorbé et remplacé par du tissu osseux lamellaire durant le processus d'ossification secondaire (1).

## 12. Ossification périostique

L'ossification périostique participe à la croissance des os courts et est responsable de l'augmentation du diamètre des os longs. Des bordures d'ostéoblastes sécrètent de l'os réticulaire sur un support de fibres de collagène provenant du périoste. Ces fibres orientées dans tous les sens permettent une continuité physique entre le tissu osseux en formation et les tissus péri-osseux. Au fur et à mesure, les travées osseuses s'épaississent par sécrétion successive de matrice osseuse par les ostéoblastes. La densification progressive de la matrice osseuse réalise des lames concentriques d'os périostique autour de la diaphyse. Cette apposition des lames de l'intérieur vers l'extérieur permet la croissance en épaisseur des diaphyses des os longs (1).

## 13. Ossification endochondrale

L'ossification endochondrale est le processus survenant au cours du développement des os longs. Elle comporte deux phases : la destruction du cartilage préexistant puis son remplacement par de l'os. Dans la partie centrale du cartilage, les chondrocytes s'hypertrophient et la matrice cartilagineuse se réduit à de fines travées. Des sels phosphocalciques précipitent sur cette matrice et donnent naissance à du cartilage calcifié dans lequel les chondrocytes hypertrophiés se retrouvent prisonniers puis meurent par apoptose. Une néovascularisation permet alors l'acheminement de cellules ostéoprogénitrices et d'ostéoclastes, qui résorbent le cartilage calcifié en formant des travées. Les cellules ostéoprogénitrices, une fois fixées sur les travées, se multiplient et se transforment en ostéoblastes qui sécrètent une matrice ostéoïde, qu'ils minéraliseront ensuite, et qui constitue l'os primaire endochondral. Cette structure sera rapidement détruite par les ostéoclastes et remplacée par de l'os secondaire (1) (Figure 12).

## 2. Ossification secondaire

L'ossification secondaire correspond à la formation d'un tissu osseux sur un support osseux, après une phase préalable de destruction de la matrice osseuse préexistante par les ostéoclastes. Elle élabore un os plus résistant et mieux vascularisé : c'est la formation des ostéons. Elle survient principalement au niveau de la diaphyse des os longs. Au cours de ce type d'ossification, des bourgeons conjonctivo-vasculaires amenant des ostéoclastes abordent

la diaphyse du côté de la cavité médullaire et du périoste. Les ostéoclastes creusent de larges canaux dans l'os lamellaire. Ces canaux sont ensuite colonisés par des cellules ostéoprogénitrices attachées à la paroi du canal et se transformant en ostéoblastes. Les ostéoblastes sécrètent de la matrice ostéoïde qui va rapidement se minéraliser. De nouvelles cellules ostéoprogénitrices se déposent sur la matrice osseuse formée et se transforment en ostéoblastes qui sécrètent à leur tour une matrice dans laquelle ils se retrouvent emmurés et ainsi de suite jusqu'à former un ostéon. C'est ainsi que l'os haversien va entièrement se substituer à l'os lamellaire périostique (1).

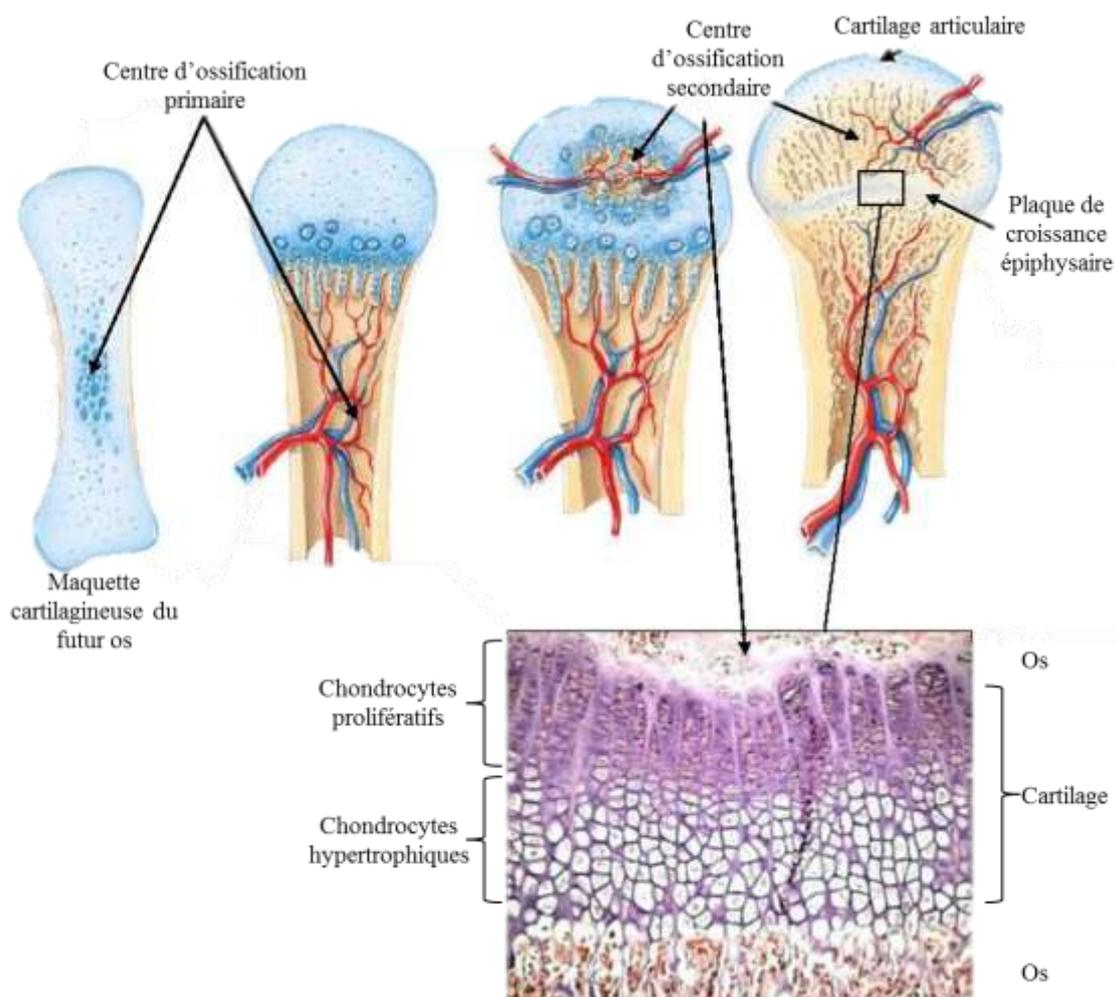


Figure 12 : Croissance osseuse par ossification endochondrale. Adapté de (74)

## C. Remodelage osseux

Chez les vertébrés, la masse osseuse reste constante après la fin de la croissance, ceci grâce à un processus complexe ; le remodelage osseux. Ce phénomène fait intervenir les deux principales cellules du tissu osseux, les ostéoclastes tout d'abord vont résorber l'os préexistant, puis les ostéoblastes interviennent pour reformer l'os résorbé par les ostéoclastes. Un cycle de remodelage osseux typique s'étale sur environ trois mois et plusieurs cycles ont lieu simultanément dans plusieurs sites osseux de sorte que la masse osseuse totale pour un individu reste constante. Ce processus est nécessaire au maintien de l'homéostasie calcique et à la conservation de l'intégrité du squelette. Le remodelage osseux est équilibré par différents facteurs locaux, cytokines ou facteurs de croissance, et des hormones systémiques.

### 1. Les étapes du remodelage osseux

#### 11. Phase d'activation

Le remodelage osseux est initié par différentes modifications physiologiques comme la baisse du taux de calcium sanguin, des changements de nature mécanique (fracture, prise de poids, etc.) ou des facteurs hormonaux (75,76).

A l'état quiescent, la surface de la matrice extracellulaire de l'os est recouverte par les cellules bordantes qui empêchent l'accès de la matrice aux ostéoclastes. Ces cellules bordantes ont une activité métabolique très réduite, mais peuvent se multiplier ou se différencier à nouveau en ostéoblastes fonctionnels sous l'influence de stimuli mécaniques ou moléculaires. Lors de la phase d'activation, sous l'action des facteurs tels que la PTH, la vitamine D3 et prostaglandine E2 (PGE2), les ostéoblastes se rétractent et laissent la place aux précurseurs mononucléés des ostéoclastes, ou pré-ostéoclastes, qui peuvent adhérer à la matrice. Les ostéoblastes situés à proximité des pré-ostéoclastes vont alors favoriser leur différenciation en ostéoclastes matures via la production de différentes cytokines dont RANKL qui va interagir avec son récepteur RANK présent à la surface des pré-ostéoclastes.

#### 12. Phase de résorption

Les cellules ostéoclastiques vont ensuite adhérer à la surface osseuse au niveau de la zone claire avec la constitution d'une zone de scellement conduisant à la polarisation de la

cellule et à la formation de la bordure en brosse. Une fois attachés à la matrice osseuse, les ostéoclastes créent un microenvironnement acide qui facilite la dissolution de la phase minérale de l'os, entraînant la libération de calcium et de phosphore, et favorise par différentes cascades d'activation les fonctions des enzymes protéolytiques (métalloprotéases et cathepsines) conduisant à la destruction de la matrice organique. La phase de résorption dure environ 30 jours.

### 13. Phase d'inversion

Les facteurs responsables de l'arrêt d'activité des ostéoclastes ne sont pas totalement élucidés. Il semblerait toutefois que des récepteurs membranaires sensibles à la concentration de calcium dans la chambre de résorption provoqueraient le détachement des ostéoclastes de la surface osseuse (77). Par ailleurs, certains facteurs stimulant la formation osseuse et intégrés à la matrice osseuse sont libérés lors des phases de résorption et stimulent l'activation des ostéoblastes (FGF, TGF $\beta$ , BMPs, etc..) (42). De plus les ostéoclastes pourraient également recruter directement les pré-ostéoblastes au niveau du site de remodelage osseux grâce à la S1P (sphingosine-1-phosphate) et la BMP6 puis stimuler la formation osseuse via l'activation de la voie Wnt/BMP (78). En parallèle, l'ostéoblaste entame son processus de différenciation qui s'accompagne de la libération de facteurs anti-résorption tels que l'OPG. Les ostéoclastes, une fois détachés, peuvent se déplacer à la surface de l'os et résorber de nouveau la matrice osseuse ou mourir par apoptose vraisemblablement médiée par le système Fas/Fas ligand (79). Ils seront alors remplacés par des cellules mononucléées de type macrophagique qui vont éliminer les derniers résidus de matrice présents dans le fond de la lacune. Cependant, certains auteurs ont suggéré que ces cellules étaient de type ostéoblastique (80).

### 14. Phase de formation

Elle débute par la prolifération des cellules ostéoprogénitrices qui vont venir tapisser le fond de la lacune de Howship, au niveau de la ligne cémentante. Les ostéoblastes vont alors synthétiser les constituants de la matrice protéique osseuse. Puis, après un délai de 10 à 15 jours, le tissu ostéoïde se minéralise par l'apposition de cristaux d'hydroxyapatite dans les espaces interfibrillaires du collagène. Cela nécessite un apport suffisant de minéraux (calcium et phosphate). Le transfert du calcium du milieu extracellulaire aux sites de nucléation

présents dans le collagène se fait à la fois par diffusion passive et par transfert actif grâce à des pompes à calcium présentes dans la membrane de l'ostéoblaste. Les ions phosphate sont aussi transférés passivement et activement dans l'ostéoblaste à partir de la matrice par l'intermédiaire d'un système de transport de phosphate dépendant du sodium. Un autre mécanisme implique les phosphatases alcalines de l'ostéoblaste, qui dégradent les pyrophosphates inorganiques, inhibiteurs de la calcification, augmentant ainsi les taux de phosphate nécessaires à la minéralisation. L'invalidation de la phosphatase alcaline chez la souris induit d'ailleurs une anomalie de la minéralisation, ce qui souligne le rôle de cette enzyme dans le processus de minéralisation (29). De plus, certaines protéines osseuses telles que l'OPN, l'ostéonectine, la BSP et des phosphoprotéines ont des sites de liaison au calcium, ce qui peut contribuer à la mise en place du processus de minéralisation de la matrice osseuse (81).

## 15. Phase de quiescence

Une fois la phase de formation terminée, alors que certains ostéoblastes meurent par apoptose ou sont emmurés dans la matrice osseuse et deviennent des ostéocytes, d'autres sont convertis en cellules bordantes qui vont recouvrir la surface osseuse et demeurer quiescentes jusqu'à une prochaine activation locale des ostéoclastes. (Figure 13)

## 2. Régulation du remodelage osseux

La régulation du remodelage osseux peut s'effectuer à différents niveaux, que ce soit dans l'ostéoclaste ou l'ostéoblaste, elle peut s'opérer sur la prolifération des précurseurs ostéoclastiques ou ostéoblastiques ou bien encore sur l'engagement ou non vers la différenciation en cellule mature et fonctionnelle. Différents facteurs sont capables de contrôler ce remodelage : des facteurs locaux, systémiques ou mécaniques.

## 21. Facteurs locaux

De nombreux facteurs ont été identifiés comme régulant le processus de remodelage osseux, ces facteurs locaux peuvent être issus directement de la matrice remodelée, produits par les ostéoclastes, les ostéoblastes, leurs précurseurs ou les nombreuses cellules immunitaires présentes dans le microenvironnement osseux.

Les facteurs les plus importants sont ceux produits par les ostéoblastes et qui s'incorporent dans la matrice osseuse, c'est-à-dire les IGF, le TGF $\beta$ , les BMP et les FGF.

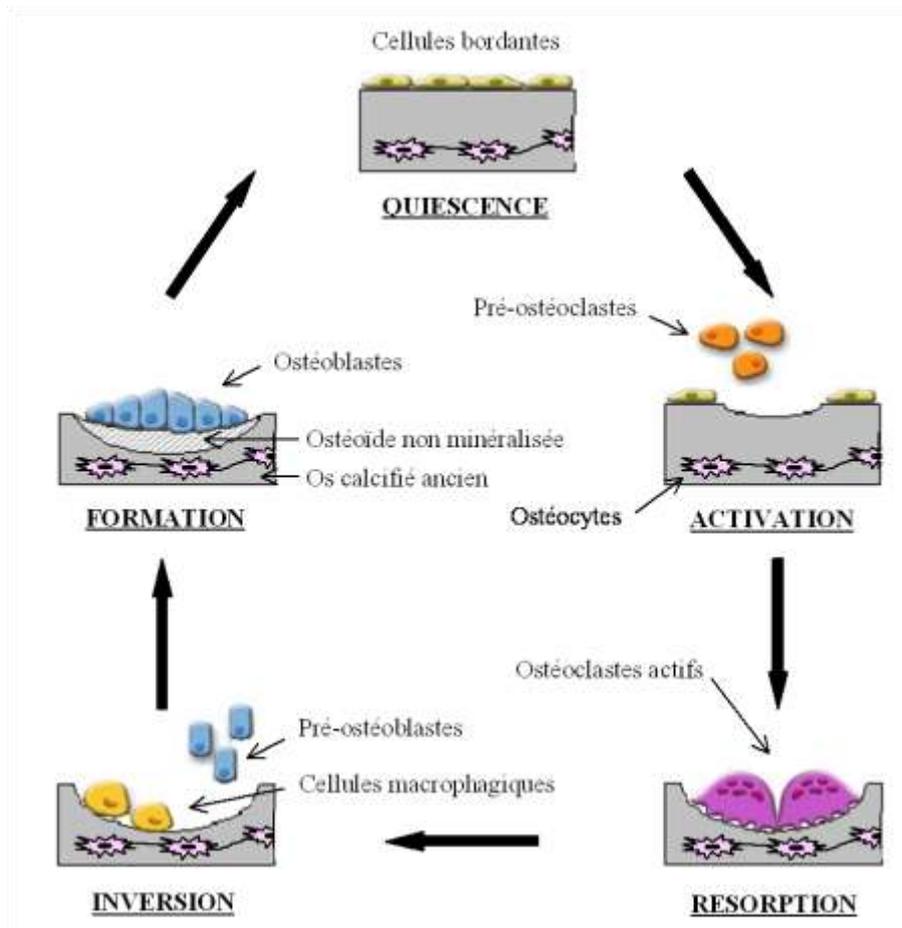


Figure 13 : Les différentes étapes du remodelage osseux.

Parmi les facteurs de croissance, les BMPs ont des propriétés inductrices *in vivo*. Elles sont directement impliquées dans le développement embryonnaire et la cicatrisation des fractures osseuses. Les BMPs, en particulier BMP-2, ont pour fonction d'induire la différenciation des ostéoblastes, ce qui provoque l'accroissement du nombre d'ostéoblastes matures et l'augmentation de leur fonctionnalité (82). D'autres facteurs de croissance tels que le FGF, les IGF, le TGF $\beta$ , le PDGF stimulent aussi la différenciation et la prolifération des ostéoblastes. Les plus étudiés, les IGFs sont stockés en grande quantité dans la matrice osseuse et stimulent la prolifération des ostéoblastes et augmentent leur synthèse de collagène de type I. De plus, l'IGF-I diminue l'apoptose des ostéoblastes (83).

Le TGF $\beta$  est stocké dans de nombreux tissus, et particulièrement dans les plaquettes, l'os et le cartilage. Conjointement au PDGF, le TGF $\beta$  est libéré par les plaquettes après

formation du caillot au moment d'une fracture osseuse. Il est également produit sous forme latente par les ostéoblastes, puis stocké dans la matrice osseuse en association avec une protéine porteuse, l'ensemble étant libéré lors de la résorption osseuse par les ostéoclastes. *In vivo*, l'effet du TGF $\beta$  dans la réparation osseuse a été étudié dans de nombreux modèles expérimentaux de réparation de fractures et de défauts de taille critique (84,85). *In vitro*, le TGF $\beta$  stimule la prolifération des pré-ostéoblastes ainsi que la production de collagène de type I et de l'ostéopontine. En dehors de ces effets anaboliques, le TGF $\beta$  contrôle la différenciation ostéoclastique en inhibant la production de RANKL et en augmentant celle de l'OPG par les cellules stromales et les ostéoblastes (56).

## 22. Facteurs systémiques

En plus d'un contrôle local du remodelage osseux permis par les cellules du micro environnement osseux, il a été mis en évidence que le système nerveux central exerçait également un contrôle sur le modelage (pendant la croissance) et le remodelage (à l'âge adulte) osseux. En effet, le groupe du Pr. Karsenty a mis en évidence le rôle majeur de la leptine dans l'homéostasie osseuse. Cette hormone qui joue un rôle clef dans la régulation du métabolisme énergétique est la principale hormone dérivée du tissu adipeux, de plus elle a la particularité de ne pas exister chez les invertébrés et d'être apparue avec le tissu osseux au cours de l'évolution (86). L'analyse du phénotype osseux des souris déficientes pour la leptine ou son récepteur a donné des résultats surprenants. En effet, ces deux mutants (souffrant d'hypogonadisme) ont une masse osseuse anormalement élevée associée à une obésité sévère (87). Elle agirait selon un processus indirect impliquant un relais hypothalamique puis un contrôle du remodelage osseux via la production de RANKL par les ostéoblastes.

Les hormones régulant le métabolisme phosphocalcique sont également impliquées dans le contrôle de ce remodelage. C'est le cas de la PTH, produite par les cellules de la glande parathyroïde. Sa production est induite par une baisse de la calcémie et elle stimule l'ostéolyse via une activation indirecte des ostéoclastes, soit via des médiateurs comme le TGF $\beta$  soit via la production de RANKL par les ostéoblastes (88).

A l'inverse, la calcitonine, produite par la glande thyroïde, est régulée par l'augmentation de la calcémie. Cette hormone va alors à la fois stimuler l'ostéoblastogenèse et inhiber l'ostéoclastogenèse (89).

## 23. Régulation mécanique

Le tissu osseux subit en permanence des contraintes mécaniques via les muscles ou tout simplement la gravité. Les ostéocytes connus pour être les principaux senseurs de ces contraintes mécaniques, jouent alors un rôle de mécanorécepteur (90). En formant un vaste réseau de prolongements cytoplasmiques, les ostéocytes vont permettre une transmission rapide et étendue des informations perçues.

Ces cellules interagissent avec les fibres de collagènes tapissant les ostéoplastes par l'intermédiaire de molécules de type intégrine et fonctionnent comme des mécanorécepteurs, percevant les modulations des contraintes mécaniques appliquées à l'os. Ils transmettent ensuite les informations aux ostéoblastes et aux cellules bordantes par l'intermédiaire des jonctions communicantes assurant une adaptation fonctionnelle du tissu osseux

Il semblerait que l'ostéocyte ne détecte pas directement les déformations de l'os mais qu'il soit sensible aux modifications de composition de la matrice extracellulaire causées par le stress mécanique. La présence de prostaglandines ou d'oxyde nitrique (NO), inhibiteurs puissants de la résorption osseuse, relargués par les cellules stromales ou médullaires activent les ostéocytes. L'ostéocyte serait alors capable d'induire l'activation et la différenciation des ostéoblastes par l'intermédiaire de l'activation de la signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine et d'initier ainsi le processus de remodelage. Les stress mécaniques importants (comme les fractures) peuvent conduire à la mort des ostéocytes par apoptose. Ces ostéocytes apoptotiques relarguent dans l'environnement des facteurs initiant le remodelage osseux (49).

## 3. Nouveaux concepts

Le remodelage osseux intervient à la fois au niveau de l'os cortical et au niveau de l'os spongieux. Cependant, les sites de remodelage pour l'os spongieux sont en contact direct avec la moelle osseuse alors que les sites de remodelage au niveau de la corticale en sont éloignés. Il a donc été suggéré que les mécanismes impliqués étaient différents. Dans l'os spongieux les cellules ostéoprogénitrices rejoindraient les surfaces osseuses directement à partir de la moelle osseuse alors que dans l'os cortical cela se ferait via la vascularisation (91). Il est maintenant indiscutable que les mécanismes généraux mis en jeu dans ces deux compartiments ont lieu dans ce que l'on nomme la « basic multicellular unit » ou BMU qui comprend les ostéoclastes, les ostéoblastes et les ostéocytes. Bien que la présence de ces BMU est

maintenant bien établie, les relations entre cette BMU et la vascularisation (particulièrement dans l'os spongieux) n'ont été que peu décrites. Hauge et collaborateurs ont montré en 2001 que les cellules de la BMU, même dans l'os spongieux, n'étaient pas directement en contact avec la moelle osseuse mais étaient recouvertes par une « canopée » de cellules (probablement des cellules bordantes) connectée aux cellules bordantes adjacentes, à la surface de l'os quiescent (92). Ces cellules bordantes sont elles aussi connectées aux ostéocytes emprisonnés dans la matrice osseuse, le tout forme un très vaste réseau communiquant via des jonctions communicantes de type GAP (92,93). Les BMU de l'os cortical et spongieux se situent donc dans un « bone remodeling compartiment » (ou BRC ; compartiment de remodelage osseux) composé d'une BMU, de la canopée de cellules bordantes et de capillaires (Figure 14).

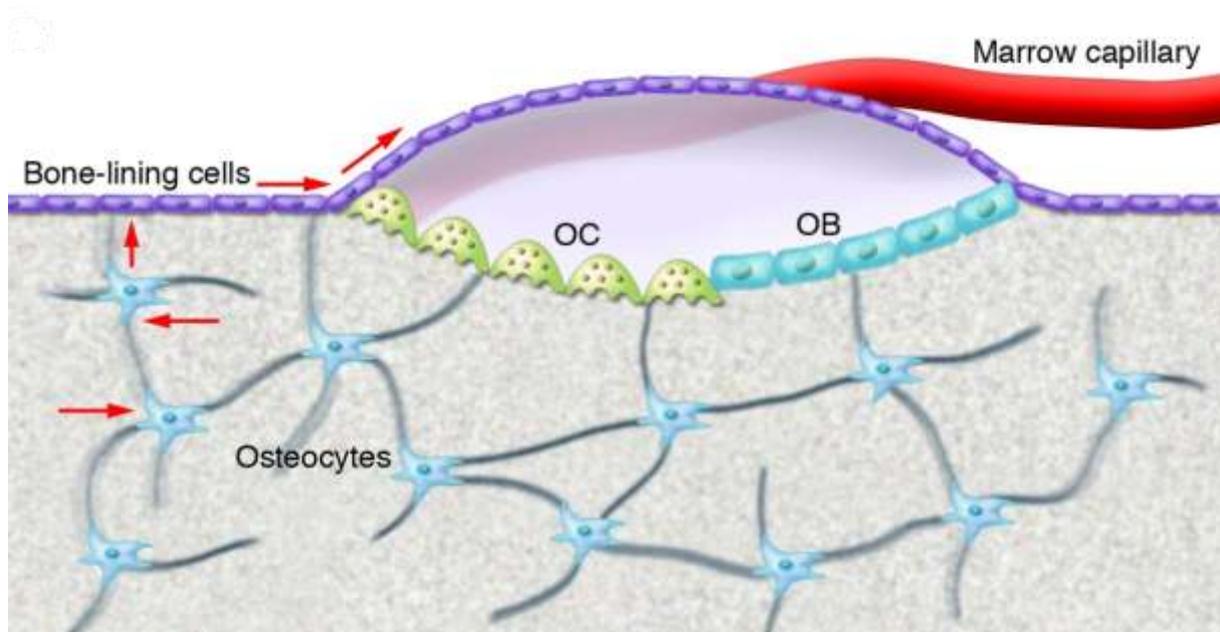


Figure 14 : Schéma d'un BRC montrant les connexions entre le réseau des ostéocytes, les cellules bordantes et une BMU. Les flèches représentent des jonctions de type GAP (d'après (94)).

Considérant la structure générale d'un BRC (Figure 14 et Figure 15) il devient aisé de comprendre le rôle central des ostéocytes dans le contrôle du remodelage osseux qui, via les cellules bordantes, peuvent détecter les microfractures, les contraintes mécaniques et les changements hormonaux. En réponse, les cellules bordantes pourront alors initier la résorption osseuse et former le compartiment clos du BRC (95,96). De façon équivalente au remodelage de la corticale qui nécessite des vaisseaux sanguins, des capillaires pénétreraient dans le BRC afin d'apporter les éléments nécessaires à la BMU (91). Les cellules

endothéliales feraient donc partie de la BMU (au même titre que les ostéoblastes ou les ostéoclastes), le VEGF produit par les ostéoblastes exerce d'ailleurs un effet anabolique sur l'os. Au sein d'une BMU, les ostéoblastes qui expriment RANKL contrôlent la différenciation ostéoclastique, en retour les ostéoclastes ayant résorbé l'os pourront stimuler la différenciation des ostéoblastes.

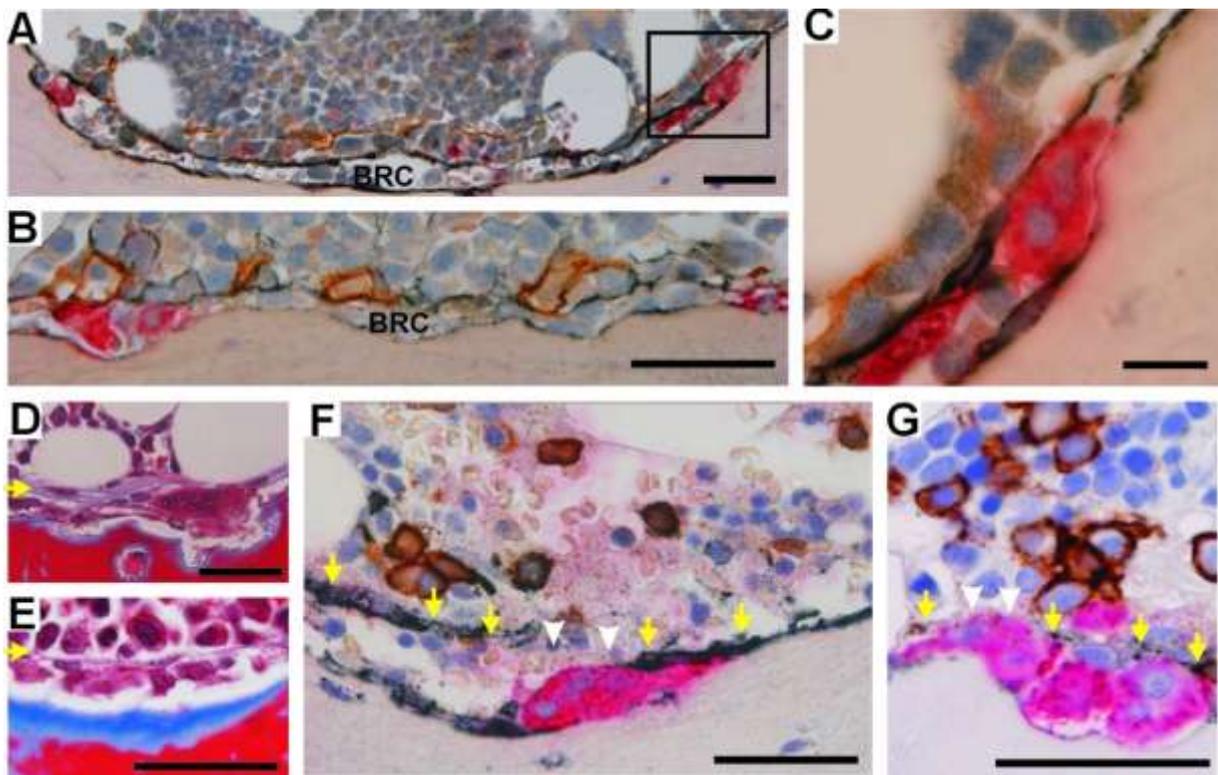


Figure 15 : Coupe histologique d'un BRC, (A) BRC complète, les cellules bordantes sont colorées en noir ; (B) marquage CD34 des capillaires en marron ; (C) Grossissement d'un ostéoclaste TRAP+ en rouge (encadré dans (A)) ; (D) & (E) BRC contenant des surfaces osseuses érodées (D) et ostéoïde (E) ; (F) & (G) deux exemples de canopées. D'après (87)

**PARTIE II :**  
**Les monocytes / macrophages en site**  
**osseux**

Les récentes avancées dans la compréhension du lien intime entre système immunitaire et biologie osseuse ont permis l'émergence d'un nouveau champ d'application : l'ostéoinmunologie. En effet, afin d'assurer l'homéostasie osseuse, le système immunitaire est capable de réguler finement les deux processus que sont la résorption et la formation osseuse. Sous certaines conditions, une sur-activation du système immunitaire en site osseux entraîne d'ailleurs le développement de pathologies ostéolytiques telle que la polyarthrite rhumatoïde (PR) (97).

Aujourd'hui, ces cellules douées de phagocytose : les macrophages ne sont plus considérés comme de simple « éboueurs » mais interviennent à l'interface entre immunité innée et acquise en réalisant la phagocytose puis la présentation antigénique. Ces macrophages, en plus de réguler le système immunitaire, semblent contrôler la physiopathologie du tissu osseux. En effet, la capacité de la lignée monocyte / macrophage à produire de très grandes quantités de médiateurs solubles (dont beaucoup sont connus pour être actif sur le remodelage), sa proximité avec l'ostéoclaste qui partage un progéniteur commun, son rôle dans l'homéostasie tissulaire et l'immunité font du macrophage un bon candidat dans l'étude de la relation entre système immunitaire et tissu osseux.

## **A. Les monocytes : précurseurs macrophagiques**

### **1. Origine et différenciation**

Les monocytes / macrophages appartiennent, avec les cellules dendritiques, à la famille des phagocytes mononucléés. Ces cellules ont pour origine des précurseurs pluripotents de la moelle osseuse, les cellules souches hématopoïétiques, qui vont se différencier en précurseurs lymphoïdes ou myéloïdes. Les précurseurs myéloïdes peuvent alors donner les granulocytes et la lignée monocyttaire. Les monocytes nouvellement formés quittent alors la moelle osseuse pour rejoindre la circulation sanguine où ils représenteront entre 5 et 10 % des leucocytes. Cette population monocyttaire est caractérisée par l'expression du récepteur au M-CSF, CSF-1R et du corécepteur au LPS, le marqueur CD14. Ils vont rester dans la circulation sanguine durant 1 à 3 jours puis, en passant la barrière endothéliale par diapédèse, ils vont pénétrer dans les différents tissus de l'organisme, ils se différencient alors en macrophages résidents ou inflammatoires selon le contexte local. Les monocytes représentent donc « le réservoir cellulaire » tandis que les macrophages sont les cellules effectrices essentielles dans

l'initiation de la réponse immunitaire innée aux pathogènes et faisant le pont avec l'immunité adaptative.

## 2. Hétérogénéité et fonctions des monocytes

Originellement, les monocytes étaient décrits et identifiés chez l'Homme grâce à leur morphologie mais le développement de la cytométrie en flux a permis de mieux les caractériser grâce l'expression du corécepteur au LPS, le CD14. Cette technologie a également permis de mettre en évidence l'existence de nouvelles sous-populations basées sur l'expression du marqueur CD16 (RFcγIII) (99,100). Cette nouvelle sous population exprime fortement le complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH II) et produit moins de TNFα en réponse à une stimulation par un ligand des TLR (toll like receptor) (101–103). Basées sur l'expression de ces deux marqueurs de surfaces, trois sous-populations sont décrites dans la littérature :

- Les monocytes classiques : CD14<sup>HIGH</sup>CD16<sup>-</sup>
- Les monocytes intermédiaires : CD14<sup>HIGH</sup>CD16<sup>LOW</sup>
- Les monocytes non-classiques : CD14<sup>LOW</sup>CD16<sup>HIGH</sup>

La première sous population CD14<sup>HIGH</sup>CD16<sup>-</sup> représente environ 85% des monocytes circulants chez le sujet sain. Ces monocytes classiques possèdent une grande capacité de phagocytose et produisent de grandes quantités de cytokines pro-inflammatoires comme le TNFα, l'IL-6 ou l'IL-1. Enfin cette population exprime fortement le récepteur aux chemokines CCR2 et faiblement le CX<sub>3</sub>CR1 (104).

A la différence des monocytes classiques, les monocytes non-classiques CD14<sup>LOW</sup>CD16<sup>HIGH</sup> qui représentent environ 10% des monocytes circulants n'expriment que faiblement le CCR2, expriment fortement le CX<sub>3</sub>CR1 et le CCR5 et expriment davantage le CMH de classe II (105). Il a été suggéré que cette sous population monocyttaire représente une population plus mature et plus proche des macrophages tissulaires résidents (106,107).

Parallèlement, chez la souris, différentes sous populations monocytaires ont également été décrites. En effet, ces monocytes murins, caractérisé par l'expression des deux marqueurs de surface F4/80 (l'équivalent d'EMR-1 chez l'Homme) et du CD11b, se distinguent par l'expression de récepteurs aux chémokines CCR2 et CX<sub>3</sub>CR1. On distingue alors une

population « inflammatoire »  $CCR2^+ CX_3CR1^-$  et une population « résidente »  $CX_3CR1^+ CCR2^-$ . La première population est recrutée sur les sites inflammatoires via un gradient de la chémokine CCL2 (ligand de CCR2) et constitue donc la fraction monocytaire inflammatoire. La seconde population pourra migrer vers les tissus afin de former les macrophages résidents ou bien rester dans la circulation sanguine afin de former un pool de monocytes résidents. Ces monocytes résidents  $CX_3CR1^+ CCR2^-$  pourraient alors contribuer à l'intégrité de l'endothélium et le maintien des populations de macrophages résidents (108).

En revanche, il semble compliqué de faire le parallèle entre les monocytes murins et les monocytes humains. En effet ces populations ne semblent pas partager de caractéristiques communes et si les monocytes humains non-classiques sont largement minoritaires vis-à-vis des monocytes classiques, les deux populations murines sont équivalentes dans la circulation sanguine (99).

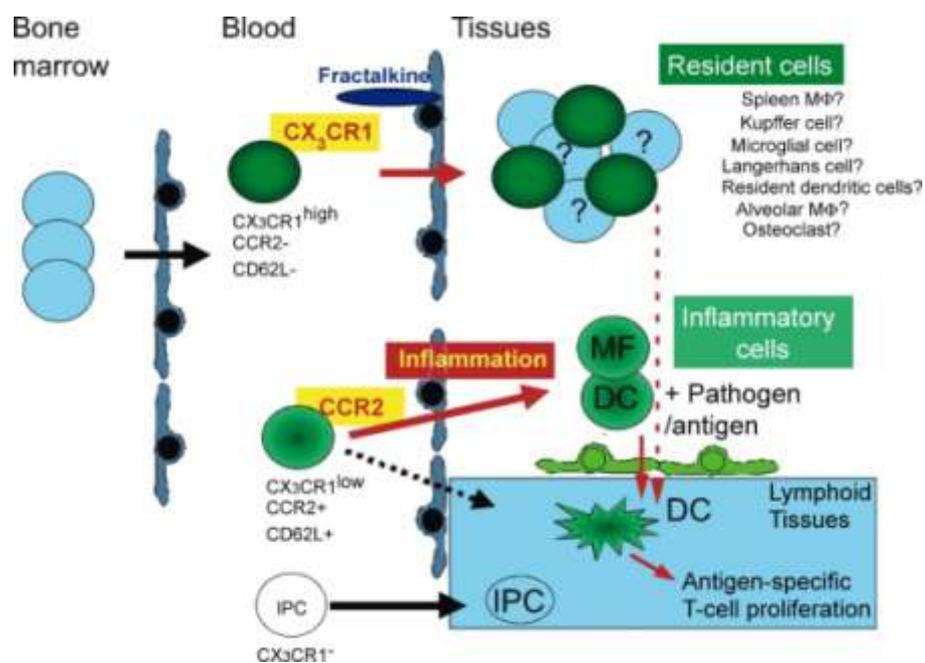


Figure 16 : Modèle de distribution des monocytes "inflammatoires" et "résidents". D'après (109).

En absence d'inflammation, les monocytes classiques  $CCR2^+ CX_3CR1^-$  pro-inflammatoires ont donc une durée de vie courte et représentent un pool de cellules disponibles rapidement en cas d'inflammation ou de lésion tissulaire et pouvant se différencier en macrophages pro-inflammatoires et en cellules dendritiques présentatrices d'antigènes. A l'inverse, les monocytes  $CX_3CR1^+ CCR2^-$  sont les précurseurs des cellules myéloïdes résidentes présentes dans les tissus physiologiques non inflammatoires (109).

### 3. Des monocytes aux macrophages

Les macrophages, disséminés dans l'ensemble de l'organisme, se distinguent des monocytes par une plus grande taille et le développement considérable de l'appareil vacuolaire (vésicules d'endocytose, endosomes, lysosomes, phagosomes, phagolysosomes). Les propriétés fondamentales des macrophages sont leur mobilité, leur pouvoir de phagocytose lié à la présentation antigénique et leur capacité sécrétrice. Cette capacité sécrétrice est multiple : fractions du complément, cytokines, facteurs hématopoïétiques, prostaglandines, radicaux libres... De plus les macrophages tissulaires ont un important rôle dans le maintien de l'homéostasie tissulaire via la clairance des cellules sénescents ainsi que dans le remodelage et la réparation de tissus lésés après un épisode inflammatoire. A l'état physiologique, les macrophages résidents expriment un large éventail de gènes leur conférant une spécialisation fonctionnelle en fonction de leur localisation dans les différents tissus de l'organisme. Ainsi les ostéoclastes (que certains considèrent comme des macrophages résidents) ont un rôle de remodelage du tissu osseux, les macrophages alvéolaires vont exprimer fortement les récepteurs de reconnaissance des motifs conservés des microorganismes afin de les éliminer des poumons.

De manière générale, les signaux responsables des caractéristiques phénotypiques que les macrophages acquièrent spécifiquement dans les tissus sont des molécules excrétées ou exprimées par les cellules de l'environnement et des composés de la matrice extracellulaire. Les molécules d'adhésion exprimées localement contrôlent la migration à travers l'endothélium, du compartiment sanguin vers le tissu. Il s'agit principalement de molécules d'adhésion (intégrines, molécules appartenant à la famille des immunoglobulines, sélectines, etc.), de cytokines comme le TGF- $\beta$ , de chémokines ou de facteurs de croissance. La question d'un recrutement ciblé de monocytes en fonction du profil des macrophages retrouvés dans le tissu reste posée. De plus, l'origine des macrophages comme dérivant uniquement des monocytes sanguins est complétée par l'hypothèse d'une prolifération locale durant les périodes d'équilibre en dehors de conditions inflammatoires.

## **B. La polarisation des macrophages**

### **1. Nomenclature**

L'inflammation due à des lésions tissulaires ou à l'infection se traduit par l'activation des macrophages résidents, ce qui augmente la production de cytokines, de chémokines, et d'autres médiateurs de l'inflammation, ainsi que le recrutement des monocytes. Dans le contexte de la réponse immunitaire adaptative, l'environnement cytokinique produit par les lymphocytes T a pour conséquence la polarisation des macrophages. Reflétant la nomenclature Th1/Th2, la polarisation des macrophages a été initialement dichotomisée en deux sous-types, les macrophages M1 qui sont induits par les cytokines Th1, IFN $\gamma$  et TNF $\alpha$  et les macrophages M2 qui sont induits par les cytokines Th2, IL-4 et IL-13 (104).

L'activation des macrophages M1 est définie comme « une activation classique ». En opposition, la polarisation dite M2 est définie comme activation « alternative ». L'utilisation du terme M2 peut-être justifié par le fait que les macrophages M2 partagent certaines propriétés fonctionnelles comme une faible capacité de production d'IL-12. L'ensemble des données de la littérature permet de définir les grands axes des propriétés fonctionnelles des macrophages M1 et M2. Toutefois, il est important de noter que les stades d'activation M1 et M2 apparaissent comme les extrémités d'un continuum de formes d'activation de macrophages avec un panel d'expression de récepteurs et de fonctions variant selon le microenvironnement.

### **2. Les macrophages M1**

Cette différenciation de type 1 est induite par l'IFN $\gamma$ , associé à un stimulus microbien tel que les LPS ou à des cytokines comme le TNF $\alpha$  ou le GM-CSF (110).

Ainsi l'interaction pathogènes-récepteurs induit la production par les macrophages de chémokines qui entraînent le recrutement de cellules de l'immunité innée productrices d'IFN $\gamma$  telles que les cellules NK. L'IFN $\gamma$  active de manière classique les macrophages qui vont alors produire de l'IL-12 (en synergie avec l'IL-18) qui constitue un signal fort pour le développement d'une réponse Th1. En retour, ces cellules Th1 vont produire des niveaux plus élevés d'IFN $\gamma$ . L'activation classique des macrophages est alors totale et déclenchée de

manière plus durable. De ce point de vue, les macrophages M1 correspondent à une activation durant une réponse immune à médiation cellulaire.

De plus l'IFN $\gamma$ , le TNF- $\alpha$  et l'IL-1 entraînent une importante chute d'expression des récepteurs aux chémokines CCR2, CCR1 et CCR5 assimilée à un « signal stop » au recrutement des monocytes/macrophages sur le site inflammatoire. En revanche le récepteur CCR7 apparaît comme un marqueur de la polarisation M1 (111). L'expression de COX-2 est également associée préférentiellement à la polarisation M1 et les prostaglandines induites sont d'abord impliquées dans l'induction des premiers stades de l'inflammation.

D'une manière générale, la polarisation M1 est donc nécessaire à la résistance contre les pathogènes intracellulaires comme les mycobactéries, les bactéries et les virus et favorise la résistance contre les tumeurs. Mais en contrepartie, cette activation M1 est impliquée dans les dommages tissulaires ainsi que dans des pathologies dues à une inflammation chronique comme la polyarthrite rhumatoïde.

### 3. Les macrophages M2

Les différents types d'activation des macrophages M2 initialement décrits comme « éteints » de l'activation M1 sont actuellement reconnus en tant que polarisations distinctes. La classification des macrophages M2 en fonction des signaux inducteurs permet de différencier les macrophages M2a, M2b et M2c. Ainsi l'exposition à l'IL-4 ou l'IL-13 induit une polarisation dite M2a ou activation alternative, les complexes immuns associés aux ligands des TLR ou du IL-1R aboutissent à une polarisation M2b et enfin l'IL-10 polarise le macrophage en une forme M2c correspondant davantage à la dénomination M2 initiale, à savoir un macrophage anti-inflammatoire, de réparation.

Le panel de récepteurs de surface exprimés diffère entre les macrophages M2 mais l'expression du Mannose récepteur est une caractéristique commune aux macrophages M2a et M2c. L'ensemble de ces macrophages M2 partagent également une faible capacité de production d'IL-12. Enfin, un critère déterminant est la production d'IL-10. De plus l'IL-10 réprime l'expression du CMH II et la production de NO des macrophages. De ce point de vue il est possible de distinguer deux ensembles de macrophages M2. Les macrophages M2b et M2c peuvent être regroupés sous le terme de macrophages « producteurs d'IL-10 ». L'IL-4 et l'IL-13 définissent alors l'activation alternative des macrophages M2a (104,111,112).

## C. Les macrophages résidents en site osseux : les OsteoMacs

Les macrophages résidents, bien que peu nombreux, jouent un rôle majeur dans le développement et l'homéostasie des organes qu'ils occupent (104). Par exemple, les cellules de Kupffer dans le foie participent aux fonctions hépatiques en éliminant, via la circulation portale, les toxines ou microorganismes ingérés (113). Dans les poumons on retrouvera les macrophages alvéolaires (ou cellules à poussière) ; dans le tissu conjonctif, les histiocytes ; dans la peau, les cellules de Langerhans ; dans le cerveau, les astrocytes et dans le tissu osseux, les OsteoMacs. Les macrophages sont également intimement liés avec les ostéoclastes, ces cellules ayant un progéniteur commun : le monocyte. Cependant, elles diffèrent de par leurs caractéristiques morphologiques, fonctionnelles et par l'expression de marqueurs spécifiques (72).

Chez la souris, les macrophages résidents expriment fortement le marqueur F4/80 (114) et le fait que les monocytes perdent très rapidement ce marqueur durant l'ostéoclastogénèse (115) en fait un bon outil pour distinguer les OsteoMacs des ostéoclastes.

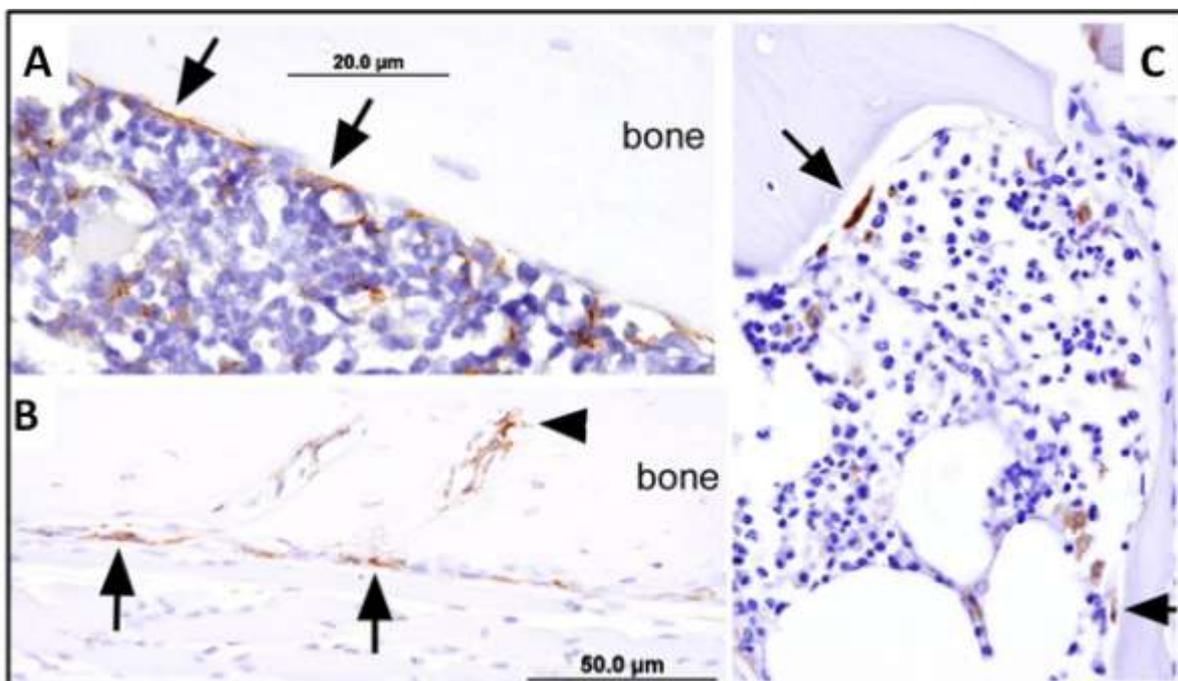


Figure 17 : Osteomacs, A-C : marquage immunohistologique F4/80 ; A : endoste ; B : périoste ; C : niche périvasculaire. D'après (116)

La présence de macrophages résidents à la proximité des surfaces osseuses (endoste et périoste) est connue depuis le début des années 80 (117) cependant leur description précise n'a été réalisée que beaucoup plus tardivement. Ces macrophages osseux ont alors été nommés OsteoMacs (en référence à la nomenclature traditionnelle des cellules osseuses) et représentent environ un sixième des cellules osseuses totales (116). Ils sont en contact direct avec les ostéoblastes disposés le long de l'endoste (les « bone lining cells »), du périoste, de l'os trabéculaire et des niches périvasculaires. Les OsteoMacs se trouvent donc au niveau des niches endostales entre les ostéoblastes et la moelle osseuse, en contact direct avec tous les ostéoblastes du tissu osseux mais également au niveau des niches périvasculaires à proximité de l'endothélium (116).

## 1. Rôles

### 11. Régulation et soutien de la niche hématopoïétique

Le terme de niche hématopoïétique a été introduit pour la première fois dans les années 1980 afin de décrire une structure spatiale et temporelle soutenant les cellules souches de la moelle osseuse (118). Aujourd'hui, deux types de niches sont décrites dans la littérature : la niche endostale en contact avec les surfaces osseuses et représentant la localisation préférentielle pour les HSC quiescentes ; et la niche périvasculaire associée à un endothélium sinusoïde et représentant le lieu préférentiel pour les divisions et le renouvellement de ces HSC (12) (Figure 18).

Le rôle des monocytes / macrophages dans la régulation des niches hématopoïétiques a été décrit pour la première fois grâce à des modèles murins via une déplétion des macrophages, ceci conduisant à une baisse significative du renouvellement et de la rétention des HSC dans la moelle osseuse (119,120). En effet, il a été montré que les macrophages pouvaient contrôler la capacité des MSC à exprimer des facteurs supportant l'hématopoïèse. Cependant, le ou les facteurs macrophagiques impliqués dans le contrôle des MSC reste à ce jour indéterminé. L'implication de différents candidats comme IGF-1, l'IL-10, l'IL-1 ou le TNF ayant déjà été écartée (119). À l'inverse les MSC Nestin<sup>+</sup> contrôlent la rétention et la migration des monocytes. En effet, en cas d'inflammation, la stimulation des TLRs sur les MSC entraîne la libération de CCL2 par ces cellules, ceci favorisant le recrutement des monocytes inflammatoires CCR2<sup>+</sup> dans la circulation sanguine (Figure 18).

Par ailleurs, si les macrophages sont impliqués dans la mise en place des niches hématopoïétiques, les ostéoclastes jouent également un rôle dans ce phénomène. En effet, une récente étude utilisant des souris *oc/oc* (dont les ostéoclastes sont non fonctionnels) a montré que les ostéoclastes en permettant la mise en place de l'ostéoblastogenèse favorise de façon indirecte le développement des niches hématopoïétiques (121).

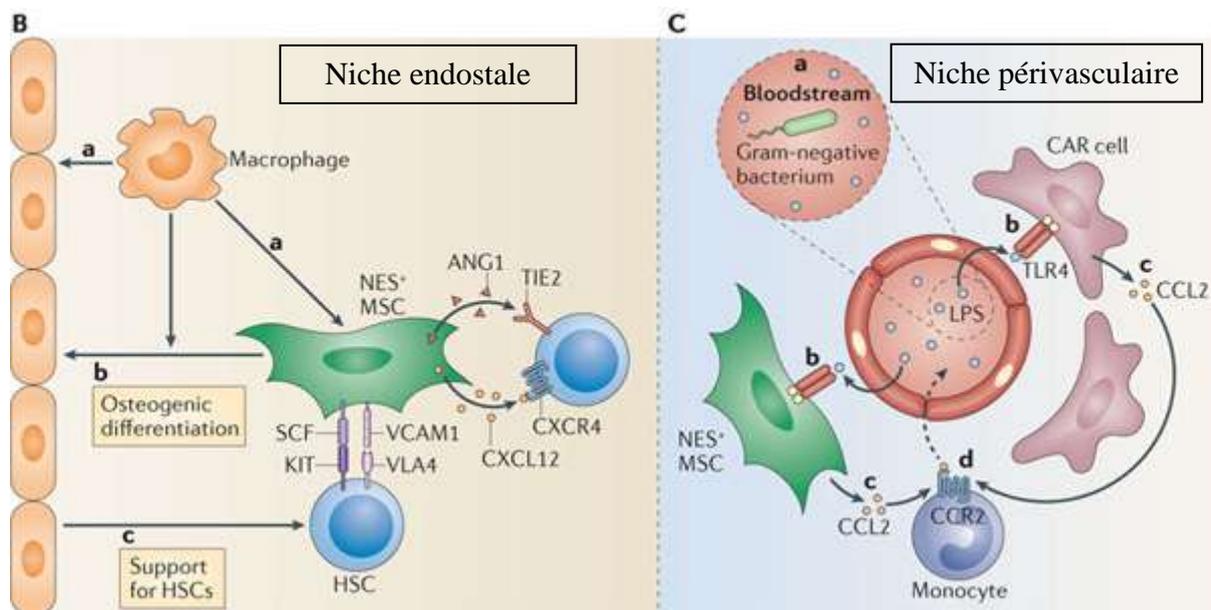


Figure 18 : Régulation des niches hématopoïétiques par les MSC et les monocytes / macrophages : B) Niche endostale : (a) les OsteoMacs stimulent la production de facteurs supportant l'hématopoïèse par les ostéoblastes et les MSC (SCF, CXCL12, ANG1, VCAM1) ; (b) stimulent la différenciation ostéogénique des MSC. C) Niche périvasculaire: (a) en cas d'infection bactérienne, le LPS est détecté par les MSC; (b) les MSC libèrent du CCL2 ; (c) cela entraîne la mobilisation des monocytes inflammatoires via leur CCR2. D'après (122)

## 12. Régulation du système immunitaire en site osseux

Faisant partie intégrante des niches endostale et périvasculaire, les macrophages comme les MSC participent aux processus inflammatoires et à la régénération tissulaire après une lésion. En effet, en produisant de grandes quantités de chémokines (CCL3, CXCL2 ou CCL12) les MSC peuvent recruter les monocytes / macrophages sur les sites inflammés (123). Ces macrophages pourront alors se polariser en macrophages de type M1 ou M2 ; les premiers ayant une très forte activité antimicrobienne et inflammatoire et les seconds étant plus impliqués dans l'immunomodulation et la réparation tissulaire via la production d'IL-10, de facteurs trophiques et la destruction des corps apoptotiques (110).

Le lien entre ces deux populations cellulaires a été démontré grâce à des co-cultures MSC / monocytes entraînant la polarisation des monocytes en macrophages M2 producteurs

d'IL-10, produisant peu de TNF et d'IFN $\gamma$  et exprimant peu le CMH II (124). Ce mécanisme implique des contacts cellules / cellules et des médiateurs solubles comme le PGE2. Par ailleurs, les médiateurs de l'inflammation tel que l'IFN $\gamma$ , le TNF ou les LPS activent la cyclooxygénase-2 dans les MSC, ce qui conduit à la production de PGE2 qui induit la polarisation M2 des macrophages via la production d'IL-10 par les macrophages en réponse au PGE2 (125).

Ce mécanisme a également été démontré *in vivo* dans des modèles de choc septique où un transfert de MSC pouvait diminuer la mortalité liée à ce choc, et ce, de façon dépendante des macrophages et de l'IL-10 (125). L'IL-10 produit par les macrophages M2 peut alors inhiber l'activation et l'infiltration des polynucléaires neutrophiles au niveau du tissu lésés et prévenir ainsi des lésions tissulaires excessives.

Les MSC semblent donc favoriser la réparation tissulaire via le recrutement de monocytes et de macrophages de type M2. De plus ces deux populations se régulent l'une l'autre afin de limiter un emballement du système immunitaire (Figure 19).

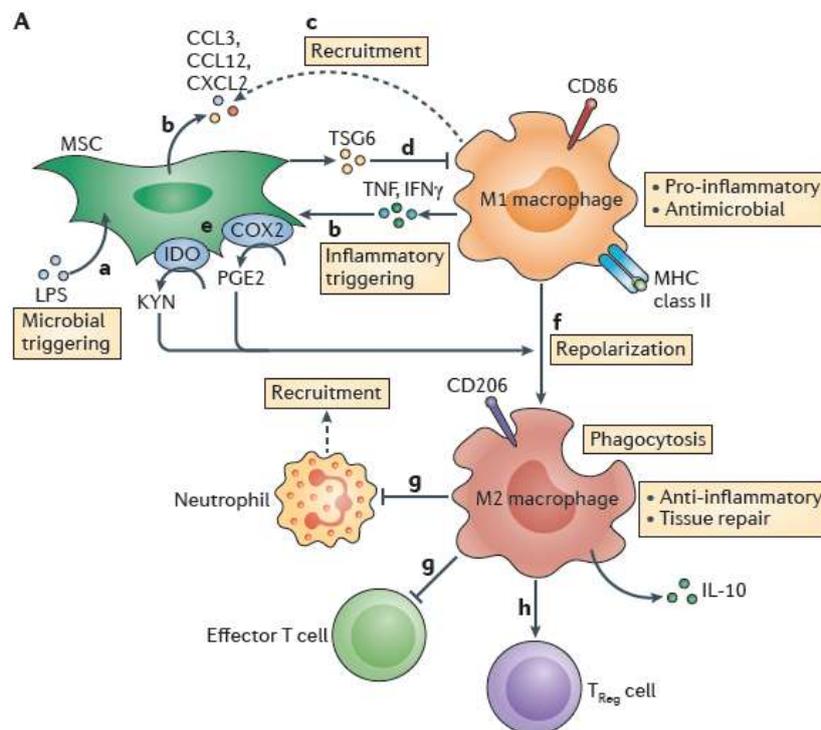


Figure 19 : Interaction entre MSC et macrophage durant la réponse inflammatoire : (a) en réponse à un signal inflammatoire (b) les MSC produisent des chémokines (c) permettant le recrutement des macrophages (d) mais inhibent également la réponse inflammatoire via un rétrocontrôle négatif. (e,f) Parallèlement, les MSC produisent des prostaglandines induisant la polarisation des macrophages M2 (g,h) qui exercent des effets immunomodulateurs. D'après (122)

## 2. Contrôle du (re)modelage osseux

Le modelage osseux est un processus anabolique qui, à la différence du remodelage osseux, n'implique pas la présence d'une balance entre résorption et formation osseuse.

Les macrophages sont déjà connus pour être capables de produire de nombreuses molécules ostéoformatrices. En effet, ils produisent de grandes quantités de TGF $\beta$  (126), d'ostéopontine (127), de vitamine D<sub>3</sub> (128), de BMP2 (129) ou d'oncostatine M (130).

La très grande adaptabilité des macrophages suggère que le rôle de ces cellules sur le tissu osseux sera influencé par les changements au niveau du micro-environnement. On peut donc penser que les OsteoMacs exercent des fonctions anaboliques en condition « normale » alors qu'ils exercent des fonctions cataboliques (via l'activation des ostéoclastes) en condition pathologique inflammatoire. En effet, *in vivo* la sur-activation locale des macrophages dans des modèles de défauts osseux entraîne la formation d'un cal osseux immature (131) ; et *in vitro* les macrophages activés par du LPS produisent de très grandes quantités de TNF $\alpha$  délétère pour l'ostéoblaste (132).

Les OsteoMacs ont été localisés au niveau des sites de remodelage osseux et forment une canopée encadrant les ostéoblastes matures (116). Leur implication dans la formation osseuse induite par les ostéoblastes a été décrite *in vitro* par Chang et al en 2008. Ils ont pu montrer qu'une déplétion des OsteoMacs présents dans les cultures primaires d'ostéoblastes ne permettait qu'une différenciation et une maturation partielle des ostéoblastes (116). *In vivo* ensuite, la déplétion des macrophages grâce à un modèle murin transgénique dans lequel l'apoptose spécifique des macrophages est induite (Macrophage Fas-induced apoptosis : Mafia) (133) entraîne une perte de la fonction des ostéoblastes (116).

Au niveau des sites de remodelage osseux, les ostéoclastes produisent des facteurs de couplage stimulant l'activité des ostéoblastes. Ainsi, du fait de la proximité cellulaire de ostéoclastes avec la lignée macrophagique, il est possible d'envisager que les OsteoMacs fournissent ces signaux anaboliques lors du modelage osseux (où les ostéoclastes sont absents). En effet, les macrophages sont capables de produire du TGF $\beta$  et expriment l'ephrine B2, tous deux produits par les ostéoclastes et impliqués dans le remodelage osseux (34,134). Les OsteoMacs seraient donc des cellules sentinelles capables de détecter les changements du microenvironnement. En réponse à un signal anabolique, ils s'organisent pour former une canopée, recrutent des précurseurs ostéoblastiques et favorisent donc le modelage osseux (Figure 20 A).

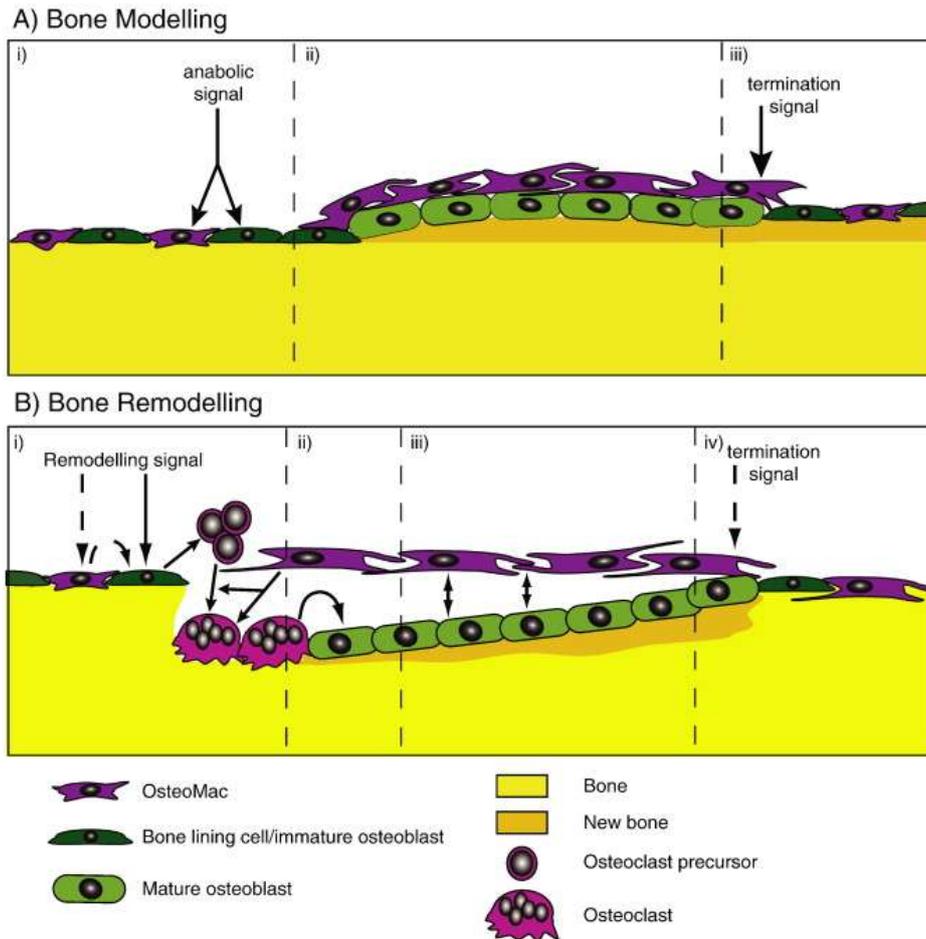


Figure 20 : Hypothèses de l'implication des OsteoMacs dans (A) le modelage osseux et (B) le remodelage osseux. D'après (135)

Pendant le remodelage osseux, l'activation de la résorption osseuse par les ostéoclastes (via RANKL et le M-CSF) entraîne alors la production, par ces ostéoclastes, de facteurs de couplage et permettant de maintenir l'équilibre entre résorption et formation osseuse.

La description des BRC par différents auteurs suggère que la formation de la canopée est permise par les cellules bordantes qui délimitent un espace clos favorisant le remodelage osseux (80,92). Cette hypothèse se base sur l'expression par ces cellules de l'ALP, l'OC ou l'ostéonectine. Cependant, il a été montré que les macrophages pouvaient également exprimer ces marqueurs sous certaines conditions (136), il est donc possible que les cellules bordantes décrites dans ces études soit en fait des OstéoMacs (Figure 20 B).

Les OsteoMacs se placeraient donc comme cellules « sentinelles » du tissu osseux. En réponse à un signal anabolique, ils recruteraient des précurseurs ostéoblastiques ou activeraient les cellules bordantes. Ils semblent donc exercer des effets très variés sur la niche osseuse, aussi la compréhension précise des conditions stimulant leurs activités anaboliques ou cataboliques est cruciale.

### 3. Remodelage osseux pathologique

Connu pour être impliqués dans la biologie du tissu osseux, les macrophages sont également nécessaires à différents niveaux lors du (re)modélage osseux pathologique, notamment lors de la réparation des fractures. Ces cellules via la sécrétion de facteurs de croissance pour les MSC supportent l'ostéoblastogenèse et favorisent la formation d'un cal stable (137). Il a également été montré que les macrophages étaient impliqués dans l'apparition des calcifications vasculaires, la co-culture entre des macrophages et des cellules musculaires lisses vasculaires entraînant la production d'une matrice minéralisée par ces dernières, et ce, de façon dépendante du TNF $\alpha$  et de l'oncostatine M (130,138).

Par ailleurs, l'implication des macrophages a été démontrée dans l'ostéoarthrite, caractérisée par un catabolisme du cartilage articulaire excessif se distinguant également par l'apparition d'excroissance osseuse autour de l'articulation lésée : les ostéophytes. En effet, la déplétion en macrophages entraîne l'absence totale de ces ostéophytes dans un modèle animal d'ostéoarthrite démontrant ainsi le rôle majeur de ces cellules dans les formations osseuses ectopiques (139,140). Les macrophages ont donc la capacité de contrôler l'ostéof ormation via des cytokines ostéof ormatrices, des MMPs ou des BMPs (129,139,141).

La présence de macrophages à proximité de l'endoste est connue depuis près de 30 ans (117) mais le rôle précis de ces macrophages de la niche endostale n'a été que peu décrite depuis. Même s'il est évident que ces OsteoMacs participent à l'homéostasie osseuse physiopathologique, la fonction précise de ces macrophages résidents est encore peu référencée.

Dans ce contexte, l'étude d'Alexander et collaborateurs a permis en 2011 de montrer l'implication de ces OsteoMacs *in vivo* grâce à des modèles de défauts osseux chez la souris. Ils ont pu montrer que ces OsteoMacs étaient présents durant de multiples phases lors de la cicatrisation osseuse permise par un phénomène d'ossification membranaire. Ces cellules (différentes des ostéoclastes puisque TRAP<sup>-</sup>) s'associent aux ostéoblastes afin de stimuler la synthèse d'une matrice extra-cellulaire puis la minéralisation de cette matrice et ce, indépendamment des ostéoclastes. Cette observation est d'ailleurs confirmée par l'utilisation de souris transgéniques « Mafia » dans lesquelles la cicatrisation du défaut osseux par apposition osseuse est très largement inhibée. De plus, la déplétion des OsteoMacs dans ce modèle étant inductible, ils ont pu montrer que l'activité anabolique des OsteoMacs intervenait majoritairement après la phase précoce inflammatoire induite par la création du

défaut (142). De même, un traitement journalier avec du M-CSF permet une amélioration significative de la réparation post-fracture (143). Cependant, le M-CSF étant également stimulateur de l'ostéoclastogenèse on peut imaginer que l'amélioration de la cicatrisation soit due à une stimulation de l'ostéoblastogenèse via les ostéoclastes (78). Bien qu'une production locale de facteurs anaboliques par les ostéoclastes ne puisse pas totalement être écartée, le faible nombre de cellules multinucléées TRAP<sup>+</sup> au niveau de la zone de modelage osseux laisse supposer que ces cellules ne sont pas impliquées. De plus, de nombreuses études utilisant des modèles animaux de défauts osseux associées à une inhibition du nombre ou de la fonction des ostéoclastes (via l'OPG (144), un anticorps anti-RANKL (145) ou des bisphosphonates (145,146)) ont démontré que les ostéoclastes ne participaient pas à la formation du cal mais à son remodelage.

Les macrophages produisent de nombreuses protéines comme le TGFβ (147), BMP-2 (129), le VEGF (148), le TNFα ou l'OSM (130) connues pour exercer une activité anabolique sur le tissu osseux, cependant le nombre élevé de ces cellules au niveau du tissu cicatriciel n'a encore jamais été corrélé avec la présence de l'une de ces molécules anaboliques.

Ces études démontrent le rôle prépondérant des OsteoMacs dans le processus d'ossification membranaire (le type d'ossification le plus souvent retrouvé en clinique du fait de la stabilisation systématique de la fracture) et placent ces cellules comme cible potentielle pour des thérapies anaboliques. L'identification du ou des facteurs de couplage entre les OsteoMacs et les ostéoblastes apparaît alors cruciale.

**PARTIE III : Consolidation des**  
**Fractures & Stratégies anaboliques**

L'os est l'un des rares tissus présentant une aptitude à se réparer, à condition que le volume osseux à combler ne dépasse pas une taille critique, et ce, grâce à sa capacité de (re)modelage (149). Les fractures représentent la plus fréquente des atteintes du système musculo-squelettique, et bien que les traitements aient considérablement évolué ces dernières dizaines d'années, une grande partie de ces traumatismes restent encore de nos jours partiellement consolidés. Les conditions de réparation fracturaire sont très variables et impliquent de nombreux facteurs comme la sévérité du traumatisme, la qualité de la réduction (réalignement de l'os long), la technique d'immobilisation utilisée ou la présence de pathologies aggravantes (150). La réparation optimale requiert donc la conservation et la stabilisation des fragments osseux grâce à des techniques (chirurgicales ou non) les moins invasives possibles. Dans les cas où les conditions de réparation sont optimales, le tissu osseux peut alors cicatriser spontanément sans lésion résiduelle et en retrouvant sa forme originale (151).

La compréhension des mécanismes physiologiques impliqués dans la réparation de ces traumatismes est donc requise ; cependant, le grand nombre de composants influant sur la réparation et la difficulté de réaliser un suivi chez l'Homme font que la majorité des connaissances actuelles sont basées sur des modèles animaux. Bien que la capacité de régénération soit supérieure chez le petit rongeur, les mécanismes de réparation, bien que plus longs, semblent être les mêmes chez les gros animaux que chez l'Homme.

Classiquement la réparation osseuse se déroule en plusieurs étapes successives, toutefois deux modes de cicatrisation sont observés selon l'environnement osseux de la fracture :

- La cicatrisation directe se déroule lorsque les fragments osseux réduits conservent leur stabilité. Alors, la cicatrisation se déroule à l'échelle microscopique, sans l'apparition d'un cal. Ce type de cicatrisation n'est observé que très rarement dans le cas de micro-fractures incomplètes et stables.
- La cicatrisation indirecte est caractérisée par l'apparition d'un cal osseux tendant à diminuer les mouvements et favoriser la cicatrisation. Ce mode de réparation se déroule en plusieurs étapes : une étape inflammatoire, une phase de réparation puis un remodelage. (Figure 21)

## A. Les étapes de la cicatrisation

Bien que les trois phases de la réparation fracturaire (inflammation, réparation, remodelage) aient été observées et décrites dans de nombreux modèles animaux différents (les différences inter-espèces étant surtout temporelles), les mécanismes de réparation ont majoritairement été décrits chez le rat.

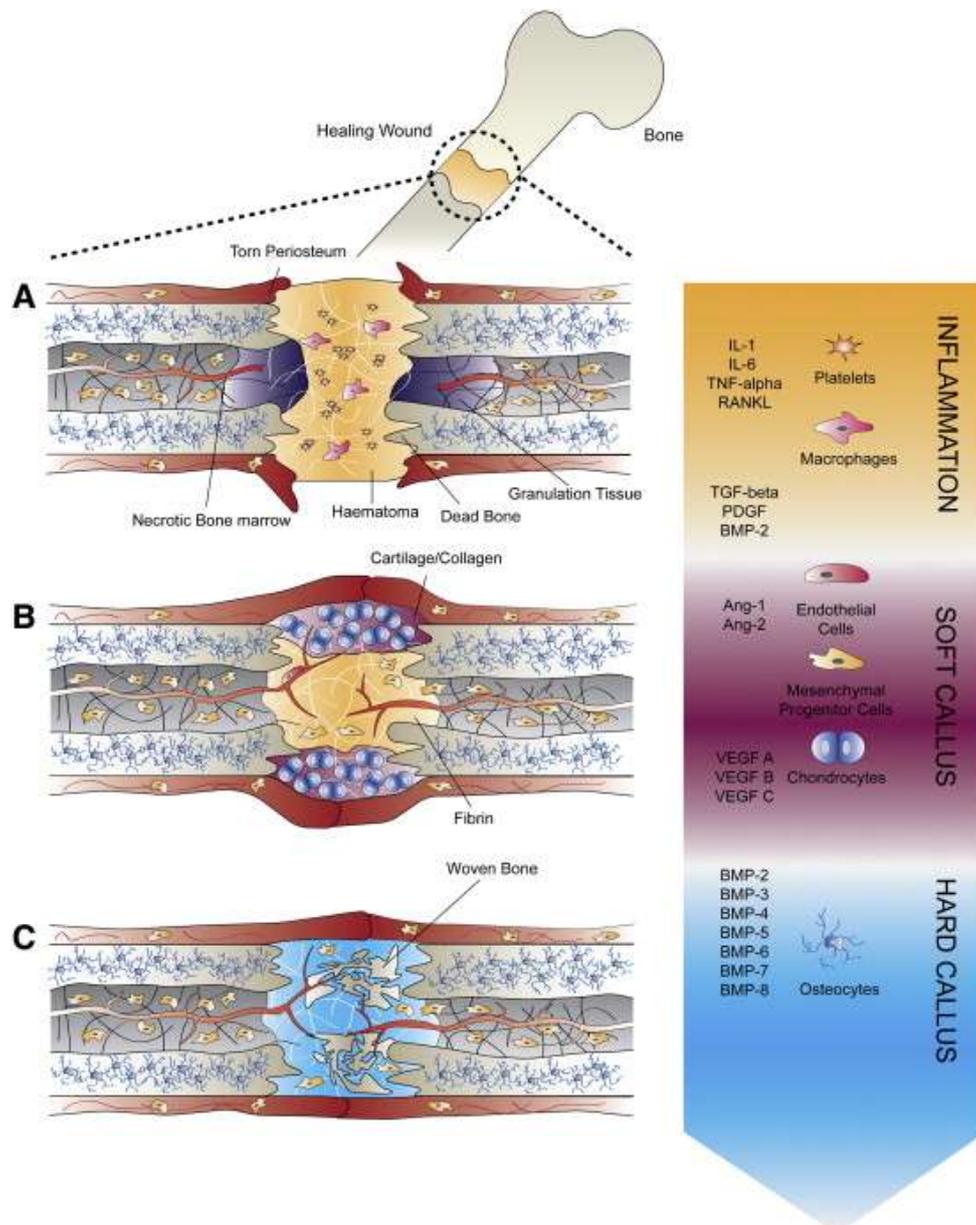


Figure 21 : Schéma général des différentes étapes de la cicatrisation et facteurs cellulaires et protéiques impliqués. (A) Phase inflammatoire (B) formation du cal mou ou cal cartilagineux (C) Formation du cal dur ou cal osseux. D'après (152).

# 1. Phase inflammatoire

Cette phase inflammatoire, en permettant l'élimination des tissus nécrosés et en préparant la réparation, se retrouve dans tous les processus de cicatrisation tissulaire. La fracture de l'os s'accompagnant nécessairement d'une rupture des très nombreux vaisseaux intraosseux, un hématome fracturaire va alors rapidement se former initiant ainsi la cascade inflammatoire et la cicatrisation (153). L'absence de cet hématome entraîne d'ailleurs un retard dans la cicatrisation dans des modèles fracturaires chez le rat (154). De plus, les tissus mous entourant la fracture vont subir une inflammation aigüe caractérisée par une vasodilatation, la libération de plaquettes et l'extravasation de nombreux leucocytes. Les plaquettes présentes entre les deux fragments osseux vont alors libérer le fibrinogène qui sera converti en fibrine entraînant ainsi la formation de l'hématome fracturaire. Ce dernier est caractérisé par une hypoxie, un faible pH et la présence de cytokines pro- et anti-inflammatoires (153).

L'hématome agit alors comme support temporaire permettant l'invasion de cellules inflammatoires supplémentaires. Les premières cellules recrutées sont les polynucléaires neutrophiles (PNN), attirées par les cellules en apoptose et les nombreux débris résultant du traumatisme (155). Elles vont rapidement s'accumuler dans les premières heures suivant la fracture. Les PNN bien qu'ayant une durée de vie courte (environ 1 jour) vont produire différentes chémokines et cytokines (comme le CCL2 ou l'IL-6) qui vont attirer sur le site inflammatoire des cellules à la durée de vie plus élevée, les macrophages (156,157). Ces derniers, à la différence des PNN, ont une influence positive sur la régénération tissulaire.

Les OsteoMacs, présents dans l'os sain au contact du périoste et de l'endoste, à proximité des cellules bordantes, semblent avoir un rôle majeur dans les processus d'ossification intramembranaires durant la cicatrisation (142). A l'inverse, les macrophages inflammatoires recrutés au niveau du site lésé sont plus impliqués dans les phénomènes d'ossification enchondrale (156). En effet, des souris déficientes pour le CCR2 (un marqueur des macrophages inflammatoires) ont un retard dans les processus précoces d'ossification enchondrale alors que l'ossification intramembranaire (plus tardive) n'est pas affectée.

Enfin, une fois que les macrophages ont été recrutés et ont exercé leurs rôles, des lymphocytes envahissent le site du cal osseux et initient une réponse adaptative (157).

Durant la phase inflammatoire, de nombreuses cytokines pro-inflammatoires (IL-1, IL-6, TNF $\alpha$ , RANKL, M-CSF, etc..), des membres de la super-famille du TGF (BMP-2, BMP-4,

BMP-5 ou BMP-6) sont libérés, montrant ainsi leurs rôles dans l'initiation de la cicatrisation et dans l'ossification intramembranaire (158). De plus, la faible vascularisation de l'hématome entraîne un phénomène d'hypoxie qui induit donc la production de facteurs pro-angiogéniques tel que l'angiopoïétine-1 puis le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) (159). La revascularisation est un critère essentiel pour la cicatrisation, cette néo-angiogenèse permet notamment le retour à la normoxie, l'évacuation des débris et l'apport en cellules et médiateurs solubles. Pour cela, les cellules endothéliales vont à partir des vaisseaux périostiques bordants la zone lésée migrer vers l'hématome et former des néo-vaisseaux (160). Ces néo-vaisseaux représentent alors une excellente source d'ostéoprogéniteurs et les péricytes entourant les cellules endothéliales pourraient également participer à la minéralisation de la matrice extracellulaire (161,162).

Cette phase inflammatoire initie donc la réparation en stimulant l'angiogenèse, la synthèse d'une matrice extracellulaire et l'attraction et la différenciation des MSC. Ces dernières en envahissant le site lésé exerceraient alors des effets anti-inflammatoires permettant de limiter l'emballement du système immunitaire (163). Cependant, même s'il faut limiter son activation, l'inflammation est nécessaire à la cicatrisation, des anti-inflammatoires non stéroïdiens comme les inhibiteurs de la cyclooxygénase 2 (COX2) étant délétères pour la cicatrisation. Cependant cette observation reste sujette à controverse puisque la COX2 exerce également des effets directs dans les ostéoprogéniteurs en inhibant leur différenciation ostéoblastique au profit d'une différenciation adipocytaire (164).

## 2. Phase de réparation

La nature de la réparation sera dépendante des contraintes mécaniques au niveau de la fracture (réparation directe ou indirecte) et de la zone lésée (épiphyse et métaphyse ou diaphyse)

### 21. Réparation directe

Ce type de réparation n'est observé que lorsque l'espace interfragmentaire est très faible ou que les fragments osseux sont comprimés et donc stabilisés. Le plus souvent, des vis et des plaques implantées chirurgicalement permettent une stabilisation suffisante de la fracture et donc une ossification directe. Dans ce cas, des systèmes de Havers sont créés faisant le pont

entre les deux fragments osseux et selon le même processus que le remodelage osseux physiologique. Tout d'abord, les ostéoclastes résorbent l'os, formant des « tunnels » traversant les deux fragments osseux. Cela favorise l'apparition de néo-vaisseaux qui permettent le recrutement et la différenciation des précurseurs ostéoblastiques. Ce type de cicatrisation est très lent, les implants permettant la stabilisation de la fracture devront donc être laissés en place pendant un certain temps. Enfin, ce processus ne fait pas ou peu intervenir de cellules inflammatoires (165).

## 22. Réparation indirecte

La stabilisation des fractures diaphysaires grâce à des fixateurs intramédullaires, des plaques ou des fixateurs externes permet désormais la consolidation de fractures ayant pourtant un espace interfragmentaire très élevé. Cette espace interfragmentaire élevé entraîne alors la formation d'un cal mou ou cal cartilagineux qui sera ensuite minéralisé en un cal dur ou cal osseux, la formation de ce cal commençant conjointement avec la phase inflammatoire.

La formation du cal mou va être permise par les chondrocytes qui vont synthétiser une matrice cartilagineuse quelques jours après la lésion. La formation de tissu cartilagineux semblerait être le résultat d'un apport sanguin insuffisant au tissu nouvellement développé se trouvant à distance du périoste sain. Ces conditions hypoxiques ne permettent donc pas l'ostéoblastogenèse mais sont favorable à la chondrogenèse (166,167).

Après quelques jours de prolifération, les chondrocytes deviennent hypertrophiques, libèrent du calcium et meurent par apoptose selon le même mécanisme que l'ossification endochondrale des plaques de croissance (168). Lorsque la périphérie du cal cartilagineux entre en contact avec les fragments osseux, les mouvements interfragmentaires et la déformation des tissus diminuent. Cela permet alors aux vaisseaux sanguins d'envahir ce tissu cartilagineux et d'induire une hyper vascularisation (167). Ces néo-vaisseaux favorisent le recrutement de MSC et de monocytes. Ces derniers pourront alors se différencier en chondroclastes qui résorberont le cartilage calcifié et les MSC en ostéoblastes qui pourront remplir les lacunes de résorption par de l'os (ossification enchondrale). Une fois que les fragments osseux se sont rejoints par de l'os nouvellement formé, les forces exercées sur le cal sont suffisamment faibles pour permettre une ossification intramembranaire.

### 3. Phase de remodelage

Une fois l'espace diaphysaire créé par la fracture comblé par de l'os néo-formé, la résorption du cal débute avec une forte activité ostéoclastique. L'os nouvellement formé au niveau de la cortical va alors être remodelé en un os lamellaire.

A la différence de l'hypervascularisation observée durant les phases de réparation, la vascularisation diminue durant cette étape afin de revenir à un niveau équivalent à celui observé avant la fracture (169). Le remodelage des cals périostique et médullaire permet le retour à une morphologie normale avec pour but final un os totalement reconstruit et possédant les mêmes propriétés mécaniques qu'un os sain (Figure 21)

## **B. Les pertes osseuses de taille critique**

Certains traumatismes, pathologies (tumeurs, infections) ou gestes chirurgicaux (résection tumorale, descellements de prothèse) entraînent des pertes de substance osseuse trop importantes pour permettre une régénération spontanée, on parlera alors de défaut osseux de taille critique. On distingue alors deux types de pertes osseuses, traumatiques ou liées à des pathologies non traumatiques.

### 1. Pertes osseuses traumatiques

Lorsque des contraintes mécaniques sont appliquées à l'os et que celles-ci dépassent la résistance du tissu osseux, cela entraîne une fracture. Dans certaines conditions, une simple immobilisation suffit à la cicatrisation mais dans le cas des fractures où l'espace interfragmentaire dépasse 2 à 3 mm la consolidation naturelle est compromise. Ces retards de consolidation sont plus fréquents dans les os longs, ces derniers étant soumis à de plus fortes contraintes mécaniques et étant moins bien vascularisés que les os plats. Par ailleurs lorsque la peau et les muscles sont également lésés, il sera nécessaire lors de l'intervention chirurgicale d'associer à la greffe osseuse une couverture du foyer de fracture par un lambeau musculaire, le tissu musculaire étant un foyer riche en cellules stromales participant à la régénération osseuse (170) et riche en vascularisation. Ce type de pertes osseuses

traumatiques représente une part importante des actes chirurgicaux en orthopédie, mais un nombre non négligeable d'interventions concerne des lésions d'autres origines.

## 2. Pertes osseuses non traumatiques

Après la fin de la croissance, la masse osseuse totale n'augmente plus mais avec le vieillissement les mécanismes de résorption prennent l'avantage sur le mécanisme de formation osseuse et ce de façon physiologique. Cependant, ce mécanisme peut être accentué par différents déséquilibres métaboliques. C'est le cas de l'ostéoporose qui représente la pathologie osseuse liée au vieillissement la plus fréquente. Elle se caractérise par une perte osseuse globale associée à une altération architecturale du tissu osseux ; cela aboutissant à une fragilisation du squelette associée à une très forte hausse de l'incidence des fractures. En France, l'ostéoporose est responsable à elle seule de plus de 150 000 cas de fractures. Parmi ces fractures, 20 % des personnes qui en sont victimes décéderont dans l'année et 70 % de ces personnes ne recouvreront pas leur état d'autonomie initial. Les données des 10 dernières années montrent un doublement des fractures liées à l'ostéoporose.

D'autres pathologies d'incidence beaucoup plus faible entraînent des pertes osseuses non traumatiques. C'est le cas des pathologies génétiques rares à caractère autosomique dominant qui sont caractérisées dans 90 % des cas par une anomalie de production du collagène de type I au niveau quantitatif ou qualitatif. L'ostéogenèse imparfaite par exemple, induit une fragilisation de l'os qui entraîne des fractures spontanées à répétition associées dans les formes les plus graves à d'importantes déformations.

Enfin, les tumeurs osseuses, qu'elles soient malignes primitives (ostéosarcomes) ou secondaires (métastases) peuvent parfois nécessiter l'exérèse de grands volumes osseux.

## **C. Stratégies anaboliques**

L'incidence moyenne des fractures des os long est estimée à 300 à 400 personnes pour 100.000 et par an (171). Pour la majorité d'entre elles, ces fractures se consolident d'elles mêmes en environ 9 mois. Pour environ 20 % de ces patients, la cicatrisation est retardée voire même impossible. Cela entraîne inévitablement une plus longue hospitalisation et de

nouveaux actes de chirurgie orthopédique. Pour ces patients il est donc nécessaire de développer des stratégies anaboliques pour le tissu osseux.

Actuellement différentes méthodes sont utilisées et deux grandes familles se distinguent : les stratégies physiques et biologiques.

## 1. Méthodes physiques

### 11. Stimulations électromagnétiques

Lorsque le tissu osseux subit un stress mécanique, ce dernier pourra être détecté par les ostéocytes qui jouent alors un rôle de mécanorécepteur et activent le remodelage osseux en réponse à ce stress. Afin de mimer ces effets, des stratégies thérapeutiques utilisent des champs électromagnétiques au niveau du site fracturaire. Si les mécanismes moléculaires mis en jeu par ce type de thérapies ne sont que très peu décrits, l'effet bénéfique de ce type de traitement l'est assez bien en clinique et a été approuvé par l'American Food and Drug Administration.

### 12. Stimulation par ultra-sons

Décrit pour la première fois en 1983 (172) les ultra-sons ont montrés un effet bénéfique dans la consolidation des fractures dans des modèles animaux puis des essais cliniques. Bien que les mécanismes précis intervenant dans cet effet ne soient pas encore vraiment élucidés, il a été montré que des ultra-sons de faibles intensités stimulent la guérison de la fracture en stimulant la production rapide de protéines de la matrice extracellulaire et probablement en modifiant la maturation chondrogénique et l'ossification enchondrale (173,174).

### 13. Greffes osseuses

De nos jours, les greffes osseuses biologiques représentent la part la plus importante des greffes réalisées en chirurgie osseuse. Elles sont très employées du fait de leurs propriétés biologiques intéressantes. Il existe différents types de greffe : la greffe autologue (prélevée sur le patient lui-même), la greffe allogénique (provenant d'un autre patient) et la xéngreffe (provenant d'une autre espèce). Avec le recul, nous savons aujourd'hui que suivant le type de greffons les propriétés biologiques vont être différentes. Par exemple, l'autogreffe présente

des propriétés ostéoconductrices (guide et soutien la formation osseuse), ostéoinductrices (induit la formation osseuse par stimulation biochimique des cellules de l'hôte) et ostéogéniques (capable de former de l'os par l'apport d'éléments tels que les ostéoprogéniteurs). Le greffon allogénique quant à lui n'est pas ostéogénique et n'est que très légèrement ostéoinducteur. La xéngreffe n'est pratiquement plus utilisée car ses propriétés biologiques sont très limitées, en effet, le xéngreffon n'est ni ostéoinducteur, ni ostéogénique et possède une ostéoconduction très limitée (175).

## 2. Thérapies anaboliques présentes et futures

Aux États-Unis, plusieurs thérapies sont actuellement autorisées par la « Food and Drugs Administration » pour la prévention et le traitement des pertes osseuses traumatiques (fracture) ou non (ostéoporose), la plupart fonctionnent en tant que molécules anti-cataboliques (ou anti-résorptives). Cependant, ces composés (comme les bisphosphonates, la calcitonine ou les régulateurs des récepteurs à l'œstrogène) ne font qu'empêcher les pertes osseuses sans stimuler la néo-formation osseuse. L'un des seuls traitements capables de stimuler cette formation osseuse et autorisés en clinique est l'hormone parathyroïdienne (PTH).

Si l'ostéoblaste semble être une cible évidente pour les thérapies anaboliques, il faut également considérer les ostéocytes et les ostéoclastes (surtout ciblés par les molécules anti-résorptives). L'association d'effets anti-catabolique et pro-anabolique semble donc être le meilleur moyen de lutter pleinement contre les pertes osseuses traumatiques ou non.

### 21. Traitement à la PTH

#### *211. Définition*

La PTH est produite par les glandes parathyroïdes en réponse à une baisse de la calcémie. Cette hormone permet alors la normalisation de la calcémie en favorisant la capture du  $\text{Ca}^{2+}$  intestinal et rénal, mais également en stimulant la résorption osseuse et donc la libération du  $\text{Ca}^{2+}$  stocké dans le tissu osseux. La PTH en se fixant à son récepteur PTH1R (PTH receptor, un récepteur couplé aux protéines G) active différentes voies de signalisation. *In vivo*, lorsque le tissu osseux est exposé à des niveaux élevés et constant de PTH, cela induit

à la fois une stimulation de l'activité des ostéoclastes et des ostéoblastes et se traduit par une densité osseuse trabéculaire inchangée (voir légèrement augmentée). En revanche, cette augmentation de la résorption osseuse induit une porosité accrue de l'os cortical. Le récepteur à la PTH étant exprimé par les ostéoblastes mais pas par les ostéoclastes (qui sont activés via la production de RANKL par les ostéoblastes après un traitement à long terme à la PTH) cela suggère que la PTH exerce une activité anabolique puis catabolique (176).

### *212. Utilisation en thérapie*

A la différence d'un traitement à long terme, des modèles animaux ont permis de montrer que de courtes expositions à la PTH recombinante permettaient de dissocier la réponse anabolique de la réponse catabolique (177). Cette observation a permis le développement de stratégies anaboliques par injections ponctuelles de rhPTH (recombinant human PTH) dans le traitement des pertes osseuses hormonales telles que l'ostéoporose (178).

Cependant, la rhPTH ne fait pas que stimuler l'ostéoblastogenèse et la synthèse d'une matrice extracellulaire, elle entraîne également la production de RANKL par ces ostéoblastes et donc stimule l'ostéoclaste. Par conséquent, même si elle est injectée par intermittence, l'usage chronique de PTH induit à terme une stimulation progressive de l'ostéoclastogenèse qui surpasse même l'effet anabolique au bout de 18 à 24 mois (178). Si la PTH a majoritairement été utilisée et étudiée pour traiter l'ostéoporose, son action sur la réparation des fractures a aussi été investiguée. Il a été montré dans plusieurs modèles animaux que des doses supra-physiologiques de PTH entraînent une hausse de la résistance du site fracturé ainsi que du volume du cal osseux favorisant ainsi la cicatrisation (179–182). Une activation de la voie Wnt a été observée dans certains modèles animaux de défauts osseux, suggérant l'implication de cette voie anabolique dans l'amélioration de la cicatrisation (179,183). En clinique, seul un essai clinique sur le rôle de la PTH dans la réparation fracturaire a été réalisé à ce jour (184), les résultats publiés en 2010 n'ont cependant pas été concluants. En effet, comme pour l'ostéoporose, il semblerait que la PTH agisse principalement sur l'os trabéculaire d'où le faible bénéfice dans la réparation des fractures diaphysaires des os longs (185). Un essai clinique randomisé est d'ailleurs en cours pour tester l'effet de la PTH sur les fractures du bassin.

### *213. Perspectives*

La PTH pouvant en plus de son effet anabolique avoir des effets cataboliques, des essais cliniques ont récemment testé l'association de la PTH avec une molécule anti-résorptive telle que les bisphosphonates. Une récente étude a pu montrer qu'une simple dose d'acide zolédronique associé à un traitement sous-cutané journalier de PTH augmentait de façon significative la densité minérale osseuse vertébrale en comparaison avec l'une ou l'autres des molécules seules (186). Les bisphosphonates sont d'ailleurs prescrits après la fin des 18 mois de traitement (en Europe ; 24 mois aux États-Unis) afin de lutter contre l'effet catabolique de cette molécule (187).

### *214. Les calcilytiques*

Le calcium extracellulaire régule la sécrétion de PTH par l'intermédiaire d'un récepteur de surface (récepteur du Calcium-CaR) couplé à une protéine G. Les molécules dites « calcimimétiques » miment les actions de taux élevés de calcémie sur le récepteur. Les calcimimétiques de type II, utilisés en thérapeutique et donnés par voie orale, agissent comme des modulateurs allostériques positifs en augmentant la sensibilité au calcium du récepteur. Des études cliniques ont permis de démontrer l'efficacité de ces molécules dans les états d'hyperparathyroïdisme (hyperparathyroïdisme I, II, ou carcinome) (77,188). À l'opposé, les calcilytiques diminuent la sensibilité du CaR au calcium, et augmentent ainsi la production de PTH. Une étude a évalué la tolérance et les propriétés pharmacocinétiques et pharmacodynamiques (essai de phase I) du Ronacaleret, un antagoniste oral du CaR, candidat potentiel dans le traitement de l'ostéoporose (189). L'analyse osseuse a permis de mettre en évidence un net effet ostéoformateur dose dépendant et sans modification significative des marqueurs de résorption. Toutefois l'étude de phase II, menée dans une population de femmes ménopausées ostéoporotiques, a été prématurément stoppée pour manque d'efficacité.

## 22. La voie Wnt

### 221. Définition

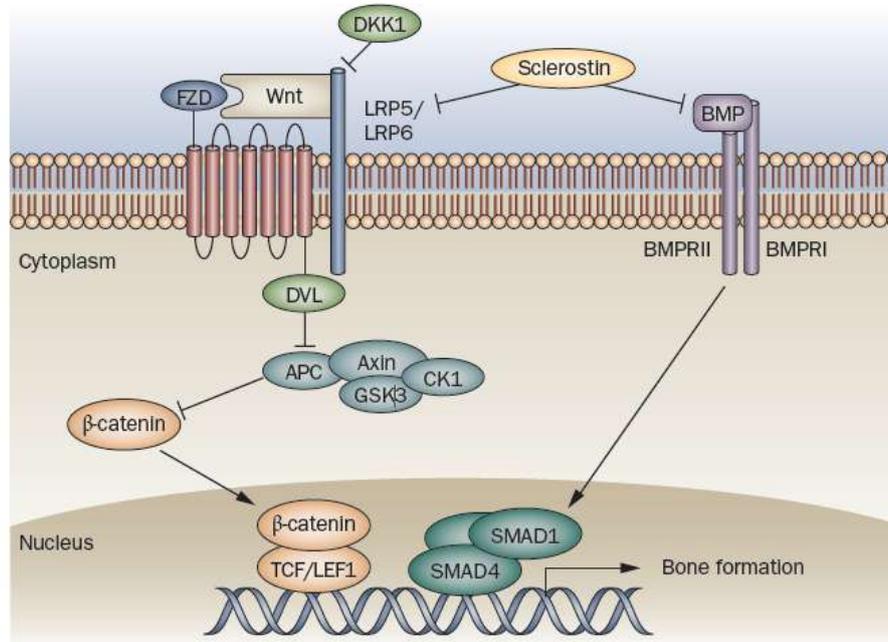


Figure 22 : DKK1, Sclérostine et voie Wnt. D'après (190)

Les Wnts sont des glycoprotéines indispensables au développement et à l'homéostasie de nombreux tissus dont l'os où elles jouent un rôle central dans la régulation de l'ostéoblaste. Les Wnts activent différentes voies de signalisation, dont la plus référencée dans l'ostéoblaste est la voie canonique, en se fixant à leur récepteur formé de LRP5 (LDL receptor-related protein 5) ou LRP6 et l'une des dix molécules Frizzled (Fz) (191).

Cette voie canonique implique la stabilisation de la β-caténine et permet la régulation de très nombreux facteurs de transcription, à la fois en condition physiologique (192) et pathologique, lors de la réparation des fractures (193). Dans l'ostéoblaste, ces glycoprotéines exercent 3 fonctions majeures, 1° elles favorisent la différenciation des MSC en ostéoblastes, 2° elles stimulent la prolifération des ostéoblastes et 3° favorisent la survie des ostéoblastes et des ostéocytes. Enfin, au sein d'une BMU, elles régulent l'ostéoclastogenèse de façon indirecte via la production de RANKL par les ostéoblastes (194) (Figure 22).

## 222. Effets sur le tissu osseux

Cette implication majeure de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine dans les cellules osseuses a été mise en évidence durant ces 10 dernières années grâce à l'observation que des mutations perte de fonction du gène codant le récepteur LRP5 entraînaient une baisse de la masse osseuse alors qu'une mutation gain de fonction entraîne le phénomène inverse dans des modèles animaux et chez l'Homme (195–198). Cette voie canonique agirait via l'activation des deux facteurs de transcription majeurs de l'ostéoblastogenèse : osterix et cbfa1 (199,200).

Si la stimulation de la voie canonique Wnt entraîne systématiquement un effet anabolique, les mécanismes mis en jeu peuvent différer selon les modes d'activation. En effet, l'activation constitutive de la  $\beta$ -caténine entraîne une augmentation de la masse osseuse via notamment une hausse de la production d'OPG et donc une inhibition de l'ostéoclastogenèse (200,201), alors qu'une mutation gain de fonction de *lrp5* ou l'administration de Wnt3a stimule l'ostéoblastogenèse sans affecter les ostéoclastes (78,202,203). Cette différence d'action est probablement due au fait que la  $\beta$ -caténine participe à d'autres voies de signalisation. Enfin, le rôle potentiel de cette voie de signalisation dans la réparation des fractures a été mis en évidence par l'observation d'une augmentation de l'expression du gène LRP5 chez le rat dans le cal fracturaire, les ostéoblastes, les MSC et les chondrocytes (204).

## 223. Utilisation en thérapie

Une possible application serait l'administration directe de Wnt aux patients mais ces molécules sont très coûteuses et difficiles à produire, limitant grandement leur utilisation en clinique. Des alternatives ont donc été testées, soit en inhibant des antagonistes de la voie Wnt (comme Dkk1, pour Dickkopf-related protein 1 ou la sclérostine) soit en stimulant l'activité de la  $\beta$ -caténine via l'inhibition de la GSK3 $\beta$  (glycogen synthase kinase 3 $\beta$ ), kinase induisant la phosphorylation puis la dégradation de la  $\beta$ -caténine.

Chez la souris, cette deuxième option a été réalisée par l'utilisation de sels de lithium qui a permis de contrer les pertes osseuses liées à l'âge, un déficit hormonal ou à des mutations de *Lrp5* (205), mais aussi de stimuler la consolidation des fractures (193). Les sels de lithium étant couramment utilisés en psychiatrie, des études ont montré que l'incidence des fractures était diminuée de façon dose dépendante chez les patients sous sels de lithium (206).

Des anticorps neutralisant Dkk1, injectés parallèlement à la création du défaut osseux, augmentent le volume du cal osseux, la résistance mécanique et la densité minérale osseuse.

Cependant, bien que les anticorps anti-Dkk1 semblent être bénéfiques dans le traitement des ostéopénies, il a également été montré que ces anticorps pouvaient entraîner l'apparition d'ostéophytes chez la souris.

Une autre cible prometteuse dans les thérapies anabolique est la sclérostine, secrétée exclusivement par les ostéocytes, son expression est diminuée par des contraintes mécaniques et par un traitement à la PTH. Des mutations perte de fonction du gène codant la sclérostine (*SOST*) entraînent une sclérostéose et la maladie de Van Buchem qui se caractérise par une activité anormale des ostéoblastes (50,207–209).

Des injections d'anti-sclérostine chez le rat âgé entraînent une hausse de la formation osseuse associée à une résistance supérieure aux fractures (210). Dans des modèles de défauts osseux, ces anticorps ont permis une amélioration significative de la cicatrisation de fractures chez le rat et d'ostéotomies chez le primate (211). Cette stimulation de la formation osseuse ne semble pas être associée à une stimulation de la résorption osseuse (212). Un essai de phase II est actuellement en cours afin d'évaluer le bénéfice potentiel d'anticorps neutralisant la sclérostine chez des patients âgés souffrants de fractures de la hanche (213).

## 23. La voie des BMPs

### 231. *Définition*

Les BMPs sont une sous famille appartenant à la super famille du TGF $\beta$ , à ce jour on dénombre environ 20 BMPs différentes et même si elles ont été originellement décrites pour leur capacité à induire l'ossification enchondrale (214), toutes ne sont pas ostéoinductrices. Ainsi, les BMPs ostéomodulatrices peuvent être subdivisées selon leurs homologies de séquences en acides aminés, en 3 familles, la première comprenant les BMP-2 et -4, la deuxième composée des BMP-5, -6, -7, -8 et la dernière par les BMP-9 et -10 (127).

Dans l'os, les BMPs sont produites par les cellules ostéoprogénitrices, les ostéoblastes, les chondrocytes et les plaquettes (215). Une fois produites, elles pourront être stockées dans la matrice extracellulaire. Dans le tissu osseux, les BMPs exercent différents effets, ostéoblastogenèse, chondrogenèse, angiogenèse, production de la matrice extracellulaire.

La voie principale de signalisation des BMP, appelée voie canonique, fait intervenir des récepteurs à activité sérine/thréonine kinase qui déclenchent la cascade de phosphorylation des Smad (Figure 22).

## 232. *Utilisation en thérapie*

Une des fonctions fondamentales des BMPs est la stimulation de la différenciation des MSC en ostéoblastes matures et de leur fonction (216). Aussi, sur la base de nombreux modèles précliniques, différents essais cliniques ont été menés et ont permis de montrer le bénéfice d'un traitement à base de BMPs sur la régénération osseuse post-fracture (217–220). En clinique, la BMP-2 a montré des effets bénéfiques chez des patients atteints de fracture tibiale, avec une cicatrisation plus rapide, un os reconstruit de meilleure qualité, des infections liées à la fracture moins fréquentes et une baisse de l'incidence de secondes interventions de chirurgie (217,221). La BMP-7 a également été testée et a montré des effets bénéfiques dans la réparation des fractures du scaphoïde et de la fibula (222,223). Aujourd'hui, cette molécule vendue sous le nom d' « OP - 1 Putty » aux Etats-Unis, est couramment utilisée en clinique dans le traitement des fractures périprothétiques, les arthrodèses articulaires ou les greffes autologues osseuses.

Les thérapies à base de rhBMPs ayant des désavantages tels que l'apparition de formations osseuses ectopiques, un coût de production très élevé ou l'apparition de boucles de rétrocontrôle négatives contre les rhBMPs, des thérapies alternatives ont été envisagées. C'est le cas d'une neutralisation de l'activité des antagonistes des BMPs de façon local, au niveau du cal fracturaire (224). A ce jour, l'utilisation de ces antagonistes est peu référencée (sauf de façons indirectes via la sclérostine, un antagoniste indirect des BMPs). Seul Noggin, un antagoniste des BMPs, semble être une cible potentielle en clinique (225).

## 24. Les facteurs de croissance

### 241. *Fibroblast Growth Factors*

La famille des FGFs est une grande famille comprenant 22 membres chez l'Homme et la souris, les membres de cette famille sont impliqués dans de très nombreuses fonctions biologiques chez les vertébrés (226). La plupart des FGFs se fixe à leur récepteur membranaire FGFR1 à FGFR4 en entraînant la phosphorylation et l'activation de différentes voies de signalisation (MAPK, PI3K, PKC ou STAT1) et des mutations pour l'un des membres de la famille du FGF entraînent de très graves défauts congénitaux de l'architecture osseuse (227).

Cette famille, en plus d'être impliquée dans le développement embryonnaire du tissu osseux, joue un rôle crucial dans le processus de cicatrisation des fractures (228). Différentes

études ont testé l'effet des FGFs (en particulier les FGF-1 et -2) sur la réparation osseuse. Le FGF1 a montré des effets bénéfiques dans la suture de défauts critiques pariétaux chez le rat (229). Le FGF2 permet une augmentation de la taille du cal, de la formation osseuse et de la stabilité de la fracture chez les rats, lapins et primates (230–233).

L'implication d'un autre membre de cette famille, le FGF 9, dans des modèles de défaut non critique de la corticale (1 mm de diamètre) a été démontré en 2010. Des souris hétérozygotes pour le gène FGF9 ont une régénération osseuse significativement inférieure aux animaux sauvages, cela est associé à une néovascularisation et une prolifération cellulaire diminuée. Pour le FGF18, le constat est le même mais sans atteinte de la néovascularisation. Dans ces deux études un traitement avec la protéine recombinante restaure les fonctions de réparation (234,235).

Les effets bénéfiques des FGFs sur la réparation des fractures semblent très dépendants du modèle étudié. Pour les fractures des os longs instables où l'ossification enchondrale joue un rôle prépondérant, les FGFs stimuleraient la formation du cal cartilagineux ce qui pourrait avoir des effets délétères. Cependant, pour les ostéotomies ou les fractures stables où le cal cartilagineux ne se forme pas, les FGFs en stimulant la différenciation des MSC et leur prolifération permettraient de favoriser la réparation (236,237).

## 242. VEGF

La cicatrisation des fractures et défauts osseux fait intervenir de nombreux processus dont l'angiogenèse qui y occupe une place centrale (238). Ce mécanisme est contrôlé par deux voies principales ; la voie de l'angiopoïétine et la plus importante, la voie du VEGF. Lors de l'ossification enchondrale, processus durant lequel le cartilage avasculaire est progressivement remplacé par un tissu osseux vascularisé, l'angiogenèse (et donc le VEGF) exerce un rôle majeur.

L'implication du VEGF dans la réparation des fractures a été mise en évidence de différentes manières : par inhibition, surexpression, injection de protéine recombinante ou libération locale via un support biocompatible. L'inhibition de l'activité du VEGF *in vivo* a été réalisée dans des modèles de défauts osseux chez la souris, le rat et le lapin ce qui a permis de mettre en évidence l'implication de ce facteur de croissance dans la reconstruction osseuse (239–242). À l'inverse, la surexpression par adénovirus ou l'injection de protéines recombinantes permet d'améliorer la reconstruction osseuse dans des modèles de fractures et de défauts osseux (243,244).

L'utilisation du VEGF en thérapie semble donc être une cible prometteuse, cependant certaines limites sont à prendre en considération. La posologie devra être extrêmement précise du fait de l'apparition d'hémangiome ou de récurrence tumorale. La stimulation de la vascularisation devant être associée à une stimulation de la formation osseuse, le VEGF devra être associé à une molécule ostéogénique tel que les BMPs, cependant la balance entre ces deux composantes et la cinétique d'administration devra être investiguée afin d'éviter un effet délétère sur la cicatrisation (241).

### 243. PDGF

Initialement décrit comme composant du plasma humain, le PDGF est produit majoritairement par les plaquettes mais aussi par les cellules musculaires squelettiques, les macrophages ou les cellules endothéliales. Il joue un rôle majeur dans le développement embryonnaire, l'organogénèse et participe au développement du système nerveux central, à l'angiogenèse et à la cicatrisation (245). Quatre isoformes du PDGF sont décrites (A, B, C et D) et ces isoformes s'associent en homo- ou hétéro-dimères pour former la forme active du PDGF (PDGF-AA, PDGF-BB, PDGF-CC, PDGF-DD ou PDGF-AB). Deux types de récepteurs sont décrits : les PDGFR- $\alpha$  et  $-\beta$ , ces deux récepteurs possèdent une activité tyrosine-kinase.

Après une fracture, les plaquettes vont s'agréger autour du site lésé et libérer de très nombreux facteurs de croissance dont le PDGF. Des études *in vitro* ont montré que le PDGF-A est exprimé par de nombreux types cellulaires (macrophages, cellules endothéliales, MSC) durant tout le processus de réparation alors que le PDGF-BB est exprimé principalement par les ostéoblastes durant les phases de formation osseuse (246). De plus, il permet de stimuler la production d'OPG par les cellules ostéoblastiques et de favoriser l'angiogenèse (247) mais aussi de stimuler la prolifération des MSC (248). *In vivo* le récepteur  $\beta$  est exprimé par les MSC et les ostéoblastes alors que le récepteur  $\alpha$  est exprimé par les chondrocytes lors de la formation du cal cartilagineux (249). Dans des modèles d'ostéotomies, l'apport de PDGF exogène permet d'augmenter la densité du cal et de stimuler la vitesse de cicatrisation (250). Chez l'homme, un essai clinique de phase I et II a été réalisé en 1997, où une simple dose de PDGF-BB associé à de l'IGF-1 a permis une amélioration significative de la croissance osseuse et du comblement de défaut osseux au niveau du parodonte (251). Cet effet bénéfique a d'ailleurs été confirmé plus récemment dans le traitement de fentes labio-palatine (252).

## 25. Le ranélate de strontium

L'activité osseuse du strontium a été décrite pour la première fois dans les années 1950 (253). Ces observations ont incité les laboratoires pharmaceutiques à synthétiser une molécule organique contenant deux atomes de strontium stable, le ranélate de strontium. Il a ensuite été montré *in vitro* et *in vivo* que le ranélate de strontium, de par sa grande proximité atomique avec le calcium, joue le rôle d'un calcimimétique et exerce donc un double effet de stimulation de l'ostéoformation et d'inhibition de la résorption ostéoclastique, améliorant les propriétés biomécaniques de l'os, sans altérer sa minéralisation (254).

Des essais de phases III ont été mis en œuvre pour évaluer le ranélate de strontium. Les résultats de l'étude SOTI ont montré une baisse significative du risque de survenue de fractures vertébrales et a permis de confirmer l'effet « découplant » du ranélate de strontium (255). Les résultats de l'étude TROPOS ont confirmé l'effet de prévention des fractures vertébrales et apporté la preuve d'une réduction du risque de fractures extra-vertébrales (256). Le mécanisme d'action mixte et original du ranélate de strontium le distingue donc des agents qui n'agissent que sur la résorption et ralentissent globalement le remodelage osseux, mais aussi des traitements purement anaboliques, comme la PTH, qui stimulent électivement les ostéoblastes. Prescrit en France depuis 2004, le rapport bénéfice / risque a été réévalué en avril 2012 par l'agence de sécurité du médicament et du produit de santé notamment en raison des risques d'accidents thromboemboliques veineux et d'hypersensibilité sévères.

**PARTIE IV :**  
**Les cytokines de la famille de**  
**l'interleukine-6 dans la biologie**  
**osseuse**

## A. les cytokines de la famille de l'interleukine 6

Les cytokines de la famille de l'IL-6 sont aujourd'hui au nombre de onze, il s'agit de l'IL-6, l'IL-11, l'IL-27, l'IL-31, l'IL-35, l'OSM, le leukemia inhibitory factor (LIF), le ciliary neurotrophic factor, la cardiotrophine-1, la cardiotrophin-like cytokine et la neuropoïétine (257). Toutes ces molécules ont en commun à la fois une structure protéique proche, des activités biologiques redondantes (sur l'inflammation, la réponse immunitaire, l'hématopoïèse, le développement embryonnaire etc..), mais également l'utilisation d'une chaîne réceptrice transmembranaire commune : la gp130 (258), à l'exception de l'IL-31 qui utilise la gp130 like (gpl) (259).

Si le partage de cette sous-unité confère aux différentes cytokines des activités redondantes, l'utilisation d'une deuxième sous-unité spécifique associée à la gp130 permet des effets propres à chacune de ces cytokines. Au cours de cette étude, nous nous sommes plus particulièrement intéressés à une cytokine de cette famille : l'OSM, mais également, et dans une moindre mesure à l'IL-6 et au LIF.

### 1. Récepteurs

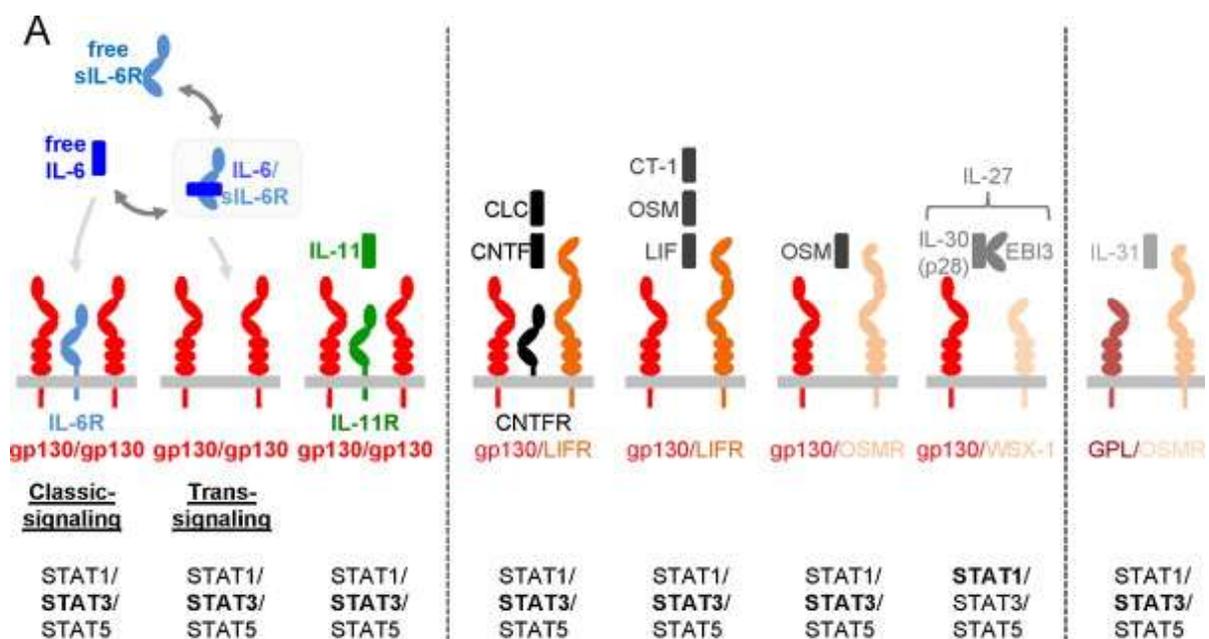


Figure 23 : la famille gp130, récepteurs et voies de signalisation majoritairement impliquées (en gras). D'après (260)

Les cytokines de la famille de l'IL-6 exercent leurs activités grâce à un complexe de récepteur, formé de glycoprotéines transmembranaires, contenant au moins la protéine de transduction du signal gp130 ou la gp1 pour l'IL-31.

La gp130, dont le gène est localisé sur le chromosome 5 chez l'homme, a une masse moléculaire de 130 kD. Sa partie extracellulaire comporte, en N-terminal, un domaine « Ig-like » suivi d'un domaine CBD (cytokine binding domain) et de trois domaines FnIII (Fibronectin type III) dans la région proximale de la membrane plasmique. La région intracellulaire est impliquée dans la transduction du signal et contient des motifs fonctionnels conservés. La protéine gp130 est exprimée de manière ubiquitaire. Au niveau osseux, elle est par exemple exprimée dans les cellules stromales de la moelle osseuse, les cellules ostéoblastiques et les cellules de la lignée myéloïde (ostéoclastes, monocytes / macrophages).

L'association de la gp130 avec une autre chaîne réceptrice formera le récepteur fonctionnel différent pour chaque cytokine de cette famille. Ces différents dimères sont présentés en Figure 23.

L'OSM est la seule cytokine capable de se lier directement à la gp130, formant ainsi un complexe de basse affinité incapable de transduire un signal. La gp130 va pouvoir constituer un hétérodimère en s'associant avec une deuxième sous-unité réceptrice, formant un récepteur de haute affinité actif. Chez l'homme il existe deux récepteurs de haute affinité pour l'OSM :

- le récepteur de type I : lorsque la gp130 s'associe avec le LIF récepteur (LIFR)
- le récepteur de type II : lorsque la gp130 s'associe avec l'OSM récepteur (OSMR)

Le récepteur de type I est utilisé également par le CNTF, la CT-1, la CLC, et bien sûr par le LIF (Figure 23). Chez l'homme, l'OSM est donc capable de transduire des signaux à la fois via son récepteur spécifique (type II), mais également via le récepteur au LIF (type I). L'utilisation d'un même récepteur explique en partie que ces deux cytokines aient de nombreux effets similaires, alors que le récepteur de type II, utilisé de façon exclusive par l'OSM, est responsable des activités spécifiques de cette cytokine (261).

Alors que la sous-unité gp130 est exprimée de façon ubiquitaire, la chaîne OSMR a une distribution plus restreinte. On la retrouve dans le tissu nerveux, les fibroblastes, les cellules épithéliales, certaines cellules de la moelle osseuse, et de nombreuses cellules tumorales ainsi que dans la trachée, le thymus et la peau. Il existe néanmoins des différences entre les espèces. En effet, chez la souris, l'OSM murine ne peut transduire un signal que via son récepteur propre, formé d'un hétérodimère gp130 murine / OSMR murine. Elle est incapable de se fixer au récepteur au LIF murin (mgp130/mLIFR) ou au récepteur humain de type I ou

II. En revanche, l'OSM humaine peut activer le récepteur au mLIF (mgp130/mLIFR) mais pas au mOSM (mgp130/mOSMR) (261,262).

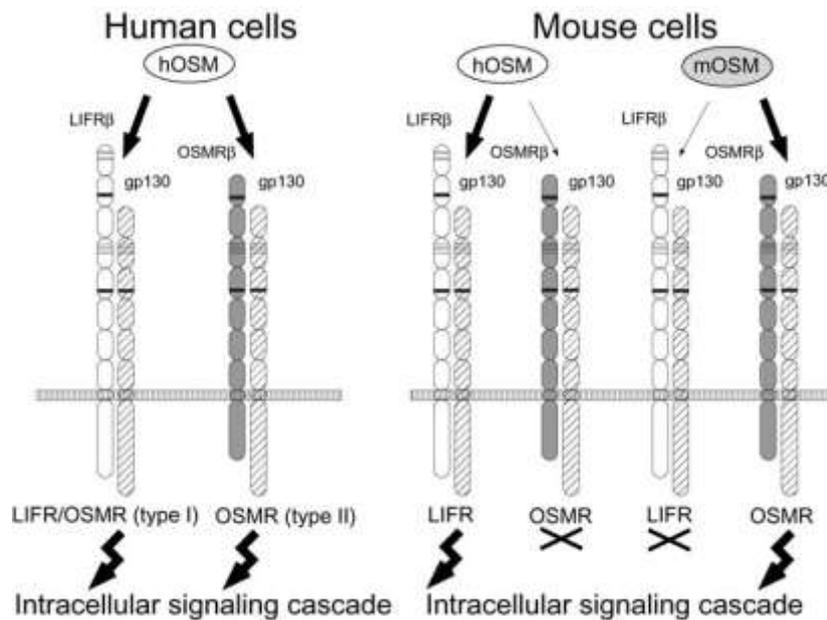


Figure 24 : Représentation des récepteurs à l'OSM et au LIF chez l'homme et la souris. D'après (263).

Les effets observés après stimulation par l'OSM humaine chez la souris comme l'induction du développement de cellules lymphocytaires T peuvent donc être attribués à l'activation du récepteur au LIF et non du récepteur à l'OSM (Figure 24).

Mais cette théorie a récemment été remise en cause par l'équipe de NA Sims. Contrairement à ce qui était admis, l'OSM murin pourrait activer le récepteur de type I dans les ostéocytes murins (voir plus bas) (264).

## 2. Voies de signalisation

La fixation des cytokines de la famille de l'IL-6 sur leur récepteur va induire la phosphorylation rapide et transitoire de résidus tyrosine conservés dans le domaine intracellulaire à l'extrémité C-terminale des chaînes réceptrices. Mais contrairement à d'autres types de récepteurs, comme les récepteurs aux facteurs de croissance, les récepteurs aux cytokines de la famille de l'IL-6 ne possèdent pas d'activité tyrosine kinase intrinsèque (265). Pour initier leur signalisation, ces cytokines utilisent des tyrosine kinases constitutivement associées à leur récepteur : les JAKs (Janus kinases).

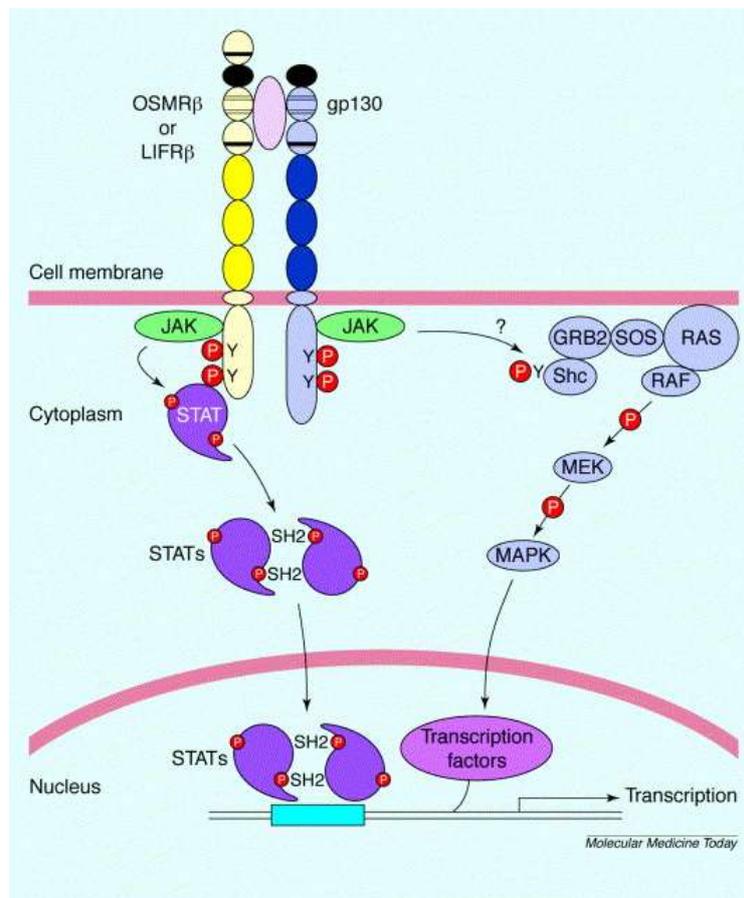


Figure 25 : récepteurs et voies de signalisation activées par l'OSM. D'après (261)

La famille des JAK compte 4 membres, JAK1, JAK2, JAK3 et TYK2 (tyrosine kinase 2). Ces kinases sont associées à la partie cytoplasmique des récepteurs, au niveau de deux motifs conservés : la boîte 1, région riche en prolines, et la boîte 2 caractérisée par une suite d'acides aminés hydrophobes suivis d'acides aminés chargés positivement. La liaison des cytokines de la famille de l'IL-6 à leur récepteur entraîne le rapprochement des sous-unités le constituant et donc des JAKs associées. Elles sont alors activées par phosphorylation, puis vont à leur tour phosphoryler des résidus tyrosine situés dans le domaine intra-cytoplasmique du récepteur au niveau de la boîte 3, créant ainsi des sites d'ancrage pour de nombreuses molécules contenant un domaine SH2 (Src homolgy 2).

Les JAK participent à de nombreuses voies de signalisation. JAK1, JAK2 et TYK2 sont exprimés de manière ubiquitaire alors que l'expression de JAK3 apparaît principalement restreinte aux lignées myéloïdes et lymphoïdes. Les cytokines de la famille de l'IL-6 activent principalement JAK1 et JAK2 (Figure 25).

## 21. Voie des STAT

La voie majoritairement activée par les cytokines de la famille de l'IL-6 est la voie des STAT (Signal Transducer and Activator of Transcription) composée de sept membres : STAT 1, 2, 3, 4, 5a, 5b et 6.

En l'absence de stimulation cytokinique, les STATs sont stockés dans le cytoplasme sous forme de monomères inactifs. Plusieurs étapes sont classiquement nécessaires pour que les STATs puissent réguler la transcription génique. Après fixation d'une cytokine sur son récepteur, les JAKs sont activées et phosphorylent le récepteur, les STATs sont alors recrutés sur ce récepteur au niveau de sites d'ancrage SH2. STAT est alors phosphorylé ce qui induit un changement de conformation permettant de libérer les STATs du récepteur. Les STATs vont ensuite former des homo- ou hétérodimères par fixation du domaine SH2 d'un STAT sur la tyrosine phosphorylée de l'autre STAT et réciproquement. Ces dimères sont relocalisés dans le noyau cellulaire de façon active grâce à un signal de localisation nucléaire. Les STATs pourront alors se lier à l'ADN (au niveau de séquences consensus présentes sur le promoteur de différents gènes) et réguler l'expression de gènes cibles. La phosphorylation des facteurs de transcription STATs est transitoire, et une fois déphosphorylées, ces molécules sont exportées du noyau vers le cytoplasme grâce à un signal d'exportation nucléaire (261).

Les cytokines de la famille de l'IL-6 peuvent activer principalement trois membres de la famille des STATs :

- STAT1, phosphorylé sur la Tyr701
- STAT3, phosphorylé sur la Tyr705
- STAT5b phosphorylé sur la Tyr694

Suite à la fixation de l'OSM sur ses récepteurs, STAT1 et STAT3 peuvent être activés par les récepteurs de type I ou de type II alors que STAT5b est activé spécifiquement par le récepteur de type II (et ne pourrait donc pas être activé par le LIF). Le rôle majeur de STAT3 dans le contrôle de la formation osseuse a également été démontré par l'utilisation de modèles transgéniques murins. En effet, des souris dont la voie de signalisation STAT3 est suractivée après fixation d'un ligand de la gp130 souffrent d'ostéopétrose. De même, la délétion de STAT3 restreinte aux ostéoblastes entraîne une ostéoporose lié à une baisse de la formation osseuse (26).

## 22. Voie des MAPK

Outre la voie des STATs, la fixation des cytokines de la famille de l'IL-6 sur leur récepteur conduit à l'activation d'une autre grande voie de signalisation : la voie des MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase). Le mécanisme d'activation de cette voie apparaît différent selon la chaîne réceptrice impliquée :

Pour la gp130 et le LIFR, la SHP2 (une tyrosine phosphatase contenant un domaine SH2) est recrutée respectivement au niveau de la phospho-Tyr759 et de la phospho-Tyr974 (403). La SHP2 activée peut à son tour recruter et activer d'autres molécules, telles que le complexe Grb2/SOS (growth-factor-receptor-bound protein / Son of Sevenless), conduisant à l'activation de Ras (266).

Pour l'OSMR, la protéine adaptatrice Shc (SH2 and collagen-homology-domain containing protein) est recrutée au niveau de la phospho-Tyr861 permettant le recrutement et l'activation en cascade des molécules Grb2, SOS, Ras, Raf et MAPK de façon plus importante qu'après le recrutement de SHP2 (267).

Les MAPK migrent ensuite dans le noyau et, par l'intermédiaire de facteurs de transcription, peuvent réguler la transcription de différents gènes.

## 23. Voie PI3K / Akt

Une troisième voie activée par les cytokines de la famille de l'IL-6 est celle de la PI3K (Phosphatidylinositol-3 kinase). La PI3K peut également être activée par divers médiateurs inflammatoires et facteurs de croissance. Le mécanisme d'activation de cette voie apparaît ici encore différent en fonction de la cytokine impliquée. En réponse à l'IL-6 la protéine adaptatrice Gab1 interagit avec la PI3K (268). En réponse à l'OSM, la PI3K s'associe avec l'IRS-1 (insulin receptor substrate-1) (269).

La PI3K est alors capable de phosphoryler le groupe 3' hydroxyl des phosphatidylinositols, lipides membranaires qui vont jouer le rôle de seconds messagers. La sérine thréonine kinase Akt est ensuite recrutée au niveau de la membrane plasmique où elle est activée par phosphorylation par une seconde kinase, PDK1 (phosphoinositide-dependent kinase-1). Les substrats de la kinase Akt sont nombreux. Akt peut inactiver la molécule pro-apoptotique Bad par phosphorylation (270). La voie PI3K /Akt est alors associée avec la survie cellulaire et la prolifération. Akt induit également la synthèse de cytokines inflammatoires et chimiokines. De ce fait, la PI3K peut jouer un rôle dans l'initiation et la progression de pathologies inflammatoires.

### 3. Activités biologiques générales

#### 31. Interleukine 6

Exerçant des effets à la fois pro- et anti-inflammatoires, l'IL-6 est produite par de nombreuses cellules incluant les monocytes/macrophages, les lymphocytes T, les cellules NK, les fibroblastes, les ostéoblastes, les progéniteurs hématopoïétiques, les cellules endothéliales et certaines cellules tumorales. Sa production est souvent induite par d'autres cytokines telles que l'IL-1 et le TNF $\alpha$  (271).

L'IL-6 se fixe à l'IL-6R puis à un homodimère de gp130. L'IL-6R est principalement exprimé par les hépatocytes, neutrophiles, monocytes/macrophages, et lymphocytes. De plus, il existe une forme naturelle soluble du récepteur (IL-6Rs), obtenue par épissage alternatif du transcrit ou par clivage protéolytique de la chaîne membranaire, qui fixe l'IL-6 avec la même affinité que la forme membranaire. Ce complexe IL-6 / IL-6Rs est capable d'induire une signalisation dans des cellules exprimant uniquement la chaîne réceptrice gp130 mais pas l'IL-6R, on parle alors de « trans-signalisation » (272,273).

Cette cytokine agit sur de très nombreuses cibles, cependant son activité est principalement la régulation du système immunitaire et de l'inflammation. En effet, l'IL-6 induit la production d'Ig par les lymphocytes B et stimule la prolifération des thymocytes et la différenciation des lymphocytes T, notamment en lymphocytes T cytotoxiques en synergie avec l'IL-2. L'IL-6 (avec le TGF $\beta$ ) joue également un rôle important dans la différenciation des lymphocytes Th17 (274).

Par ailleurs, l'IL-6 stimule la production des protéines de la phase aigüe de l'inflammation par le foie (275) et favorise l'infiltration leucocytaire en activant l'endothélium (276). La présence de cette cytokine a d'ailleurs pu être corrélée avec de nombreuses pathologies inflammatoires telles que l'arthrite rhumatoïde, l'ostéoporose ou le psoriasis (277). Enfin, elle agit sur la prolifération des progéniteurs hématopoïétiques multipotents et est également impliquée dans la différenciation des macrophages et des mégacaryocytes (278).

## 32. LIF

Découverte en 1969, cette cytokine doit son nom à sa capacité à inhiber la prolifération et induire la différenciation macrophagique d'une lignée de cellules de leucémie myéloïde M1 (279). Le LIF est sécrété par de nombreux types cellulaires dont les fibroblastes, les lymphocytes T activés, les monocytes/macrophages, les cellules souches mésenchymateuses, les cellules ostéoblastiques, les cellules endothéliales, les astrocytes mais également les cellules tumorales (280). Son récepteur est un hétérodimère formé de la chaîne réceptrice LIFR associée à la chaîne gp130. Même si les formes humaines et murines de la cytokine et de son récepteur présentent une grande identité de séquence (78% d'homologie entre mLIF et hLIF et 76% d'homologie entre mLIFR et hLIFR), il existe des problèmes de cross-réactivité entre espèces. Le LIF de souris ne peut se fixer qu'au LIFR de souris alors que le LIF humain peut se lier au LIFR humain et murin (281).

La caractéristique première de cette cytokine est le maintien de la pluripotence des cellules souches embryonnaires. Il a en effet un rôle majeur en contrôlant la prolifération et la différenciation des cellules souches embryonnaires murines via STAT3, et est utilisé en routine pour cultiver ces cellules. Cet effet est dépendant de l'espèce puisque les ESC humaines n'ont pas besoin de LIF mais plutôt de FGF pour maintenir leur statut indifférencié (282). Dans les cellules souches embryonnaires de souris, la signalisation LIF/STAT3 induit l'expression de différents facteurs de transcription associés à l'état de cellule souche. Selon le contexte cellulaire, STAT3 pourrait être associé à différents partenaires tels que NANOG comme cela a été montré dans certaines cellules tumorales ou C-MYC et KLF4, tous les deux importants pour l'autorenouvellement des cellules souches embryonnaires murines (283).

En plus de son activité d'inhibition de la différenciation, le LIF exerce des effets immunomodulateurs. En effet, des taux élevés de LIF sont associés à une meilleure tolérance dans le cadre d'une transplantation, ceci en régulant la fonction cellulaire des lymphocytes T régulateurs (284). De plus, sa production est maintenue au cours de la gestation par la progestérone, vraisemblablement pour induire un environnement de tolérance immune (285). A l'inverse, la production de LIF peut être associée à des pathologies inflammatoires ou autoimmunes et notamment dans l'arthrite ou le psoriasis (286). Enfin, le LIF est naturellement produit par la paroi utérine, sous le contrôle du pic d'oestradiol et est particulièrement important pour l'implantation du blastocyste (287).

### 33. Oncostatine M

Comme les autres cytokines de la famille de l'IL-6, l'OSM exerce des effets très variés comme stimuler l'inflammation, le remodelage de la MEC, l'hématopoïèse ou la prolifération / différenciation cellulaire. Du fait de la présence d'un récepteur commun avec le LIF, elle partage des activités biologiques avec cette cytokine. S'il est difficile de différencier l'effet du récepteur de type I de celui de type II chez l'homme, la souris est un bon modèle d'étude pour distinguer ces deux effets (Figure 24).

L'OSM est produite par les lymphocytes T activés, macrophages activés, cellules dendritiques et neutrophiles (288,289). Elle est exprimée fortement dans les tissus hématopoïétiques comme la moelle osseuse, le thymus et la rate. D'un point de vue pathologique, l'OSM est exprimée localement dans des maladies inflammatoires telles que la polyarthrite rhumatoïde ou le psoriasis. Au sein des tumeurs, il semble que cette cytokine soit produite par les macrophages ou neutrophiles infiltrant la tumeur plutôt que par les cellules tumorales (290).

#### *331. Rôles sur l'inflammation*

Capable d'induire la production des protéines de la phase aigüe, l'OSM induit également la production d'IL-6 dans les cellules endothéliales. Sur ces mêmes cellules endothéliales, l'OSM favorise le « rolling » puis l'extravasation des leucocytes (via une augmentation de l'expression de la p-selectin) ainsi que l'infiltration de polynucléaires éosinophiles au site inflammatoire en stimulant l'expression de chimiokines telles que l'eotaxine-1 (291–294).

Au niveau cutané, l'OSM participe à l'inflammation et à la cicatrisation, une augmentation de son expression a d'ailleurs été constatée dans les lésions de psoriasis et de dermatite atopique (295). La production d'OSM, suite à l'injection d'un adénovirus codant l'OSM murine au niveau du genou de souris induit une inflammation localisée avec destruction du cartilage et de l'os sous-chondral. Cependant en plus de ces effets cataboliques un effet anabolique est observé au niveau du périoste (296).

Lors d'une réaction inflammatoire, le remodelage de la MEC joue un rôle important pour la cicatrisation des tissus endommagés. L'OSM augmente la production de MMP dans les chondrocytes humains et participe alors à la destruction du cartilage (297). Produite localement par les macrophages des patients atteints de PR, l'OSM est donc associée à la fois à une dégradation de la MEC et à une stimulation de la production de médiateurs

proinflammatoires. A l'inverse, l'OSM peut réguler négativement le processus inflammatoire, par exemple en inhibant l'expression de l'IL-8 et du granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) induits par l'IL-1 dans des cultures de fibroblastes (298).

### *332. Rôles sur l'hématopoïèse*

Présente en abondance dans les tissus hématopoïétiques, l'OSM s'est avérée importante pour la prolifération des progéniteurs hématopoïétiques multipotents, stimulant également la formation de cellules endothéliales (299). En fait, l'OSM favorise l'hématopoïèse adulte principalement en activant les cellules stromales de la moelle osseuse pour assurer le maintien des niches hématopoïétiques (300). L'OSM est également impliquée dans la lymphopoïèse et sa surexpression conduit à un phénotype autoimmun létal et à des modifications dans le développement du tissu lymphoïde, une splénomégalie ainsi que des ganglions volumineux dus à une lymphoprolifération de cellules T (301). Ces cellules T extra-thymiques proliférant plus vite que les cellules T classiques, elles acquièrent des caractéristiques de cellules T mémoires mais sont plus sensibles à l'apoptose (302). Il a été montré que l'expression de l'OSM, du LIF et de l'IL-6 était augmentée avec l'âge et était associée à une sévère atrophie du thymus et donc à une baisse du nombre de thymocyte, phénomène qui a été confirmé par des injections de ces 3 cytokines chez des animaux jeunes (303). Par conséquent, l'OSM régule l'hématopoïèse à différents niveaux et dans différents organes lymphoïdes.

### *333. Rôles dans la biologie hépatique*

Cultivés en présence d'OSM, des progéniteurs hépatiques de rat ont une croissance très ralentie et adoptent une morphologie d'hépatocytes. De plus, des marqueurs caractéristiques des cellules hépatiques adultes sont exprimés alors que les marqueurs foetaux disparaissent, démontrant une induction de la différenciation hépatique par l'OSM (304). Lors du développement embryonnaire, l'OSM stimule la maturation fonctionnelle des hépatocytes foetaux en induisant l'expression de marqueurs hépatiques, l'accumulation de glycogène et la synthèse lipidique. Le facteur de transcription STAT3 s'est avéré essentiel pour le développement hépatique induit par l'OSM, alors que l'activation de Ras semblait réguler négativement ce processus (305). Plus récemment, l'utilisation de souris invalidées pour le gène du récepteur à l'OSM (souris OSMR<sup>-/-</sup>) a confirmé l'importance de la voie de signalisation activée par l'OSM ou par les autres cytokines utilisant la chaîne réceptrice

OSMR telles que l'IL-31 dans le phénomène de régénération hépatique. En effet, après exposition au tétrachlorure de carbone CCl<sub>4</sub>, les souris OSMR<sup>-/-</sup> ont montré une prolifération hépatique et un remodelage tissulaire lent et incomplet comparé aux souris sauvages (306).

### *334. Rôles dans l'organisation du système nerveux central*

L'OSM est également impliquée dans le développement du système nerveux et notamment des neurones nociceptifs. En effet, les souris knock-out pour l'OSM montrent une baisse de la sensibilité à la chaleur, aux stress mécaniques et aux douleurs viscérales (307). Par ailleurs, l'OSM joue un rôle neuroprotecteur important puisqu'elle réduit la mort neuronale induite par le NMDA (N-méthyl-D-aspartate) (308).

## **B. Rôles sur la croissance et le remodelage osseux**

Les cytokines et récepteurs de la famille gp130 sont exprimés dans la plupart des cellules osseuses, ce profil d'expression est résumé dans le Tableau 2 (309).

Au sein des BMU, l'expression de ces cytokines est relativement élevée durant toute la vie. De plus, l'expression de ces cytokines est finement régulée par différentes cytokines pro-inflammatoires ou hormones actives sur le tissu osseux. En effet, dans les ostéoblastes, la PTH, la vitamine D3, l'IL-1, l'estradiol ou la testostérone régulent la production de ces cytokines. Cela indique que cette famille, comme RANKL, joue un rôle majeur dans le contrôle du remodelage osseux au sein des BMU en conditions physiologiques et pathologiques.

	Osteoclast	Osteoblast	Osteocyte	Chondrocyte	Synovial fibroblast
<b>Receptors:</b>					
gp130	+(105)	+(22)	+(43)	+(104)	+(111)
IL-6R	+(105)	+(107)	+(109)	+(110)	-(112)
IL-11R	+(22)	+(22)	Not reported	Not reported	-(111)
LIFR	-(106)	+(106)	+(43)	-(104)	-/+ (111)
CNTR	Not reported	+(108)	Not reported	Not reported	Not reported
OSMR	-(43)	+(43)	+(43)	+(104)	+(111)
WSX-1	Not reported	+(37)	Not reported	Not reported	+(113)
<b>Ligands:</b>					
IL-6	Occasional (25)	+(114)	Occasional (25)	+(117)	+(70)
IL-11	Not reported	+(22)	Not reported	+(118)	+(22)
LIF	Not reported	+(115)	Not reported	+(119)	+(70)
OSM	-(43)	+(43)	+(43)	Not reported	-(70)
CT-1	+(14)	-(14)	-(14)	+(120)	Not reported
CNTF	+(28)	+(116)	+(28)	+(28)	Not reported
IL-27	Not reported	Not reported	Not reported	Not reported	Not reported

Tableau 2: profil d'expression des cytokines et récepteurs de la famille gp130 dans les cellules osseuses (309).

## 1. Interleukine 6

Comme la plupart des cytokines de la famille, l'IL-6 présente des effets duals sur la différenciation ostéoblastique et ostéoclastique. L'IL-6 associée à son récepteur soluble peut dans certains cas stimuler la différenciation ostéoblastique *in-vitro* (310) et dans d'autres inhiber cette différenciation (311,312). De même, l'IL-6 peut stimuler la formation des ostéoclastes de façon directe (313) ou indirecte via RANKL (314) ou bien encore l'inhiber (315). Cette cytokine semblant être très active sur les cellules osseuses, il a donc été très surprenant de constater que les souris IL-6 *-/-* n'avaient aucun phénotype osseux particulier (316). En revanche ces souris sont résistantes à l'ostéoporose induite par l'ovariectomie (316), aux effets cataboliques de la PTH (317) et à l'arthrite induite (318). À l'inverse, des souris sur-exprimant l'IL-6 ont un nombre d'ostéoblastes significativement réduit ainsi que des défauts du développement du squelette (319,320). Concernant les modèles de réparation osseuse, il a été montré que l'association des propriétés anaboliques de la PTH et des propriétés de l'IL-6 sur le remodelage permettait un effet bénéfique synergique dans la réparation fracturaire (321). De même dans des modèles de fracture chez des souris déficientes en IL-6, un retard dans la formation d'un cal mature, la reformation osseuse et le remodelage a été observé. Cependant, ces effets étant transitoires, l'IL-6 exercerait ces effets surtout dans les stades précoces de la cicatrisation (322).

## 2. LIF

*In vitro*, le rôle du LIF dans la physiologie de l'os est controversé puisque selon les cas, cette cytokine peut stimuler la différenciation ostéoclastique (314) ou l'inhiber (323) et stimuler la différenciation ostéoblastique (324) ou l'inhiber (325) selon le mode de stimulation des précurseurs ostéoblastiques.

Chez l'homme une mutation du LIFR entraîne une dysplasie squelettique ainsi qu'une sévère ostéopénie létale pour l'individu. Cependant, ce phénotype n'a à ce jour pas été corrélé avec une analyse de la fonction des ostéoclastes et des ostéoblastes (326). Chez la souris, comme pour la gp130, la délétion du LIFR est létale dès la naissance. Les nouveaux nés souffrent de sévère ostéopénie et ont la caractéristique d'avoir des ostéoclastes de taille anormalement élevée (327). Par ailleurs, étant donné que le LIFR permet également la signalisation de la CT-1, de la CLC et du CNTF, l'effet du LIF doit être étudié via des KO spécifiques de la cytokine plutôt que de son récepteur (Figure 23).

La surexpression du LIF via injection intraveineuse de cellules infectées par un rétrovirus codant le LIF, entraîne une hausse largement significative du LIF circulant, entraînant chez ces souris une forte augmentation du volume trabéculaire osseux ainsi que du nombre d'ostéoblastes dans la cavité médullaire (328). Sachant que le LIFR est exprimé par les ostéoblastes mais pas par les ostéoclastes (Tableau 2) cela implique une action directe du LIF sur les ostéoblastes.

A la différence du LIFR, l'inactivation du LIF chez la souris n'est pas létale et les souris atteignent l'âge adulte sans atteinte majeure. Elles souffrent de défauts modérés dans l'hématopoïèse et le développement du thymus et sont de taille anormalement faible (329). Plus récemment, le phénotype osseux de ces souris LIF  $-/-$  a été publié. Si le nombre d'ostéoblastes chez ces souris semble inchangé, le nombre d'ostéoclastes ainsi que leur taille est augmentée. Même, si la capacité à résorber de ces ostéoclastes géants n'a pas été étudiée, cette hausse du nombre d'ostéoclastes est associée à une baisse du volume trabéculaire osseux (323). Cette étude a récemment été complétée par Poulton et al, qui ont montré que le LIF exerçait des rôles distincts selon le microenvironnement. En effet l'absence de LIF entraîne une augmentation du VEGF et de la vascularisation au niveau de la plaque de croissance ce qui conduit, à terme, à une augmentation du volume osseux localisé. A l'inverse, au niveau de l'os cortical et trabéculaire, le LIF, via l'inhibition de la sclérostine, permet de stimuler la formation osseuse et sa délétion entraîne une ostéopénie (330) (Figure 26).

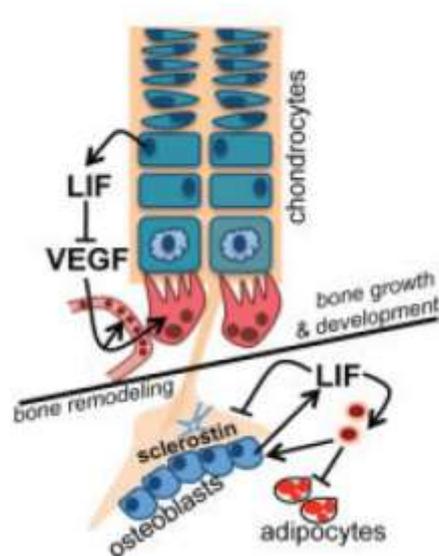


Figure 26 : Role du LIF sur les cellules osseuse. D'après (330)

### 3. Oncostatine M

Il est maintenant bien établi que l'oncostatine M est pro-ostéoclastique mais cet effet nécessite la présence des ostéoblastes de façon dépendante de RANKL (313,314,331). *In vivo*, la surexpression de l'OSM par des adénovirus stimule d'ailleurs davantage les ostéolyses dans des modèles d'arthrite. Cela confirme donc un effet indirect de l'OSM sur l'ostéoclaste via les ostéoblastes producteurs de RANKL, d'autant que les ostéoclastes n'expriment ni le LIFR ni l'OSMR, à la différence des ostéoblastes qui expriment les deux chaînes réceptrices (264,332).

Concernant les ostéoblastes et leurs précurseurs mésenchymateux, il a été montré que l'OSM stimule l'expression de l'ALP, la différenciation ostéoblastique jusqu'au stade ostéocytaire et la minéralisation de la MEC, au dépens de l'expression de marqueurs adipocytaires (46,333,334). De plus, dans d'autres types cellulaires, il a été montré que l'OSM stimulait l'expression de C/EBP $\delta$  (un facteur de transcription impliqué, avec cbfa1, dans l'ostéoblastogenèse) via STAT3 (335). *In vivo*, la surexpression de l'OSM par adénovirus entraîne une augmentation de l'activité phosphatase alcaline ainsi qu'une augmentation de la formation osseuse au niveau du périoste (296). Malaval et al. ont montré que parmi les cytokines de la famille gp130, et dans des modèles de cultures primaires d'ostéoblastes issus de la calvaria de rat, seul l'OSM via son récepteur de type 2 (gp130/OSMR) semble avoir un effet anabolique. Cela est en désaccord avec des études

précédentes montrant un effet anabolique *in vitro* et *in vivo* pour l'IL-6 ou le LIF (328,336) mais ces différences pourraient être directement liées à l'origine embryonnaire de ces précurseurs ostéoblastiques. En effet, alors que les MSC de la moelle osseuse sont d'origine mésodermique, les pré-ostéoblastes de la calvaria sont d'origine neuroectodermique.

Afin de préciser le rôle anabolique de cette cytokine, ainsi que ses possibles liens avec les autres cytokines de la famille de l'IL-6, des analyses complémentaires sont nécessaires *in vivo*. Dans ce cadre l'utilisation de souris knock-out pour le gène codant l'OSMR (qui à la différence des souris LIFR -/- sont viables) (300) et pour le gène codant l'OSM, (307), sont des outils indispensables.

Si le phénotype osseux des souris OSM -/- n'a à ce jour pas été décrit, le phénotype osseux des souris OSMR -/- a été décrit pour la première fois par le groupe de N.Sims en 2010. Une augmentation de la masse osseuse a été observée chez ces animaux (nouveau-nés et adultes) confirmant donc l'implication de l'OSM dans le développement normal du squelette et dans le remodelage osseux. Chez ces animaux la résorption et, dans une moindre mesure, la formation osseuse sont altérées ceci conduisant à un phénotype ostéopétrotique. De plus, ils ont pu montrer qu'alors que l'OSM murin stimule l'ostéoclastogénèse via la production de RANKL par les ostéoblastes et de façon dépendante de l'OSMR ; l'OSM murin stimule également la formation osseuse *in vivo* via l'OSMR dans les ostéoblastes et via le LIFR et l'inhibition de la production de sclérostine dans les ostéocytes (Figure 27).

Bien que la fixation de l'OSM murin au récepteur de type I (gp130/LIFR) soit de faible affinité (262), cette étude montre donc que l'OSM induit la formation osseuse via son récepteur gp130/LIFR et, contrairement à la PTH, de façon indépendante de l'ostéoclastogénèse. Cela est d'ailleurs confirmé par la capacité de l'OSM murin à induire une augmentation de l'épaisseur de la calvaria d'animaux OSMR-/-, via une baisse de la production de sclérostine par les ostéocytes.

Dans des modèles fracturaires, Paul Moxham a montré en 2009 le rôle de l'OSM en tant que molécule ostéoinductrice (c'est-à-dire permettant le recrutement et la différenciation de précurseurs ostéoblastiques mésenchymateux) dans des modèles de défauts osseux critiques au niveau de la calvaria de lapins (337).

L'OSM agirait donc selon deux voies différentes, soit une stimulation de la résorption et de la formation osseuse via le récepteur gp130/OSMR, soit une stimulation de la formation osseuse via le récepteur gp130/LIFR à la surface des ostéocytes. Aussi elle semble être une cible privilégiée dans l'optique de nouvelles thérapies anaboliques découplées d'un effet catabolique.

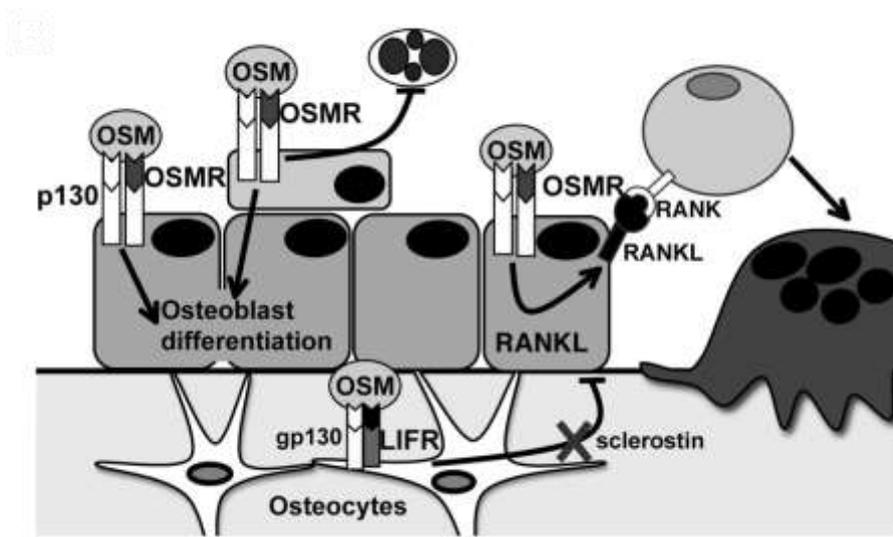


Figure 27 : l'OSM induit la production de RANKL via l'OSMR et inhibe la production de sclérostine via le LIFR

# OBJECTIFS DE LA THESE

Le tissu osseux est un tissu conjonctif complexe en perpétuel remaniement, reposant sur l'équilibre de deux mécanismes: la formation et la résorption osseuse. La régulation du remodelage osseux est basée sur l'intervention de nombreuses hormones, cytokines et facteurs de croissance. Ces molécules sont capables de contrôler les deux types cellulaires responsables de l'homéostasie osseuse: les ostéoblastes et les ostéoclastes. Dans des conditions physiologiques, la résorption osseuse induit l'activation de la formation osseuse, les ostéoclastes et ostéoblastes se régulent donc l'un l'autre afin de permettre un remodelage harmonieux. En effet, les ostéoblastes, en plus de leur activité de formation osseuse sont en mesure de contrôler la résorption osseuse via notamment la production de RANKL. A l'inverse, les ostéoclastes peuvent contrôler la différenciation et la maturation des ostéoblastes via des médiateurs solubles tels que Wnt10b et la BMP6 (69,78).

Depuis peu il est établi qu'en plus d'être contrôlée par les ostéoclastes, la formation osseuse peut être régulée par le système immunitaire dans des conditions inflammatoires ou non. Cette observation a permis l'apparition d'un nouveau domaine de recherche: l'ostéoinmunologie. Par exemple, il a été montré que les lymphocytes T produisaient des cytokines pro-inflammatoires telles que le  $TNF\alpha$ , le  $TGF\beta$  (338) ou l'IL-17 (339,340) capables d'induire la différenciation ostéoblastique et la minéralisation par des MSC.

Dans ce contexte, la capacité de la lignée monocyte / macrophage à produire de très grandes quantités de médiateurs solubles (dont beaucoup sont connus pour être actifs sur le remodelage), sa proximité avec l'ostéoclaste avec qui elle partage un progéniteur commun, son rôle dans l'homéostasie tissulaire et l'immunité font de la lignée monocyte / macrophage un bon candidat dans l'étude de la relation entre système immunitaire et tissu osseux. Récemment, une étude menée par un groupe australien a en effet démontré l'implication d'une nouvelle sous population de macrophages résidents en site osseux: nommée OsteoMacs par analogie avec les autres cellules osseuses. Cette étude a permis de mettre en évidence la présence de ces OsteoMacs au contact des ostéoblastes de l'endoste et leur implication dans la formation osseuse induite par les ostéoblastes. Dans une seconde étude, ils ont ensuite pu vérifier l'implication de ces OsteoMacs dans un modèle animal de défaut osseux. Cependant, le ou les facteurs de couplage intervenant entre les OsteoMacs et les ostéoblastes n'ont pas encore été décrits.

Aussi, les objectifs de cette thèse ont été de :

- Identifier le ou les facteurs de couplage entre monocytes / macrophages et ostéoblastes
- Mieux comprendre les modes de production de ces facteurs dans les différentes populations de monocytes / macrophages
- Mieux comprendre les mécanismes moléculaires par lesquels ces facteurs induisent l'ostéogenèse
- Démontrer l'expression de ces facteurs lors de l'inflammation et des différentes phases de la cicatrisation osseuse
- Confirmer l'implication de ces facteurs dans des modèles de défaut osseux chez la souris

A plus long terme, ces études ont pour but d'identifier de nouveaux agents anaboliques pour le tissu osseux. Ces agents, seuls ou associés à des biomatériaux et/ou des cellules souches, pourraient être proposés aux patients souffrant de traumatismes osseux d'importance telle que la cicatrisation nécessite une chirurgie et/ou un traitement anabolique.

# RESULTATS

**PARTIE I :**

**l'OSM est produit par les monocytes /**  
**macrophages activés *in vitro* et**  
**participe à la formation osseuse *in vitro***  
**et *in vivo***

## A. Introduction

L'identification des facteurs de couplage faisant le pont entre ostéoclastes et ostéoblastes apparaît comme une nécessité dans la compréhension de la biologie osseuse. D'ores et déjà, il est clairement établi que le facteur de couplage majeur produit par les ostéoblastes et stimulant l'ostéoclastogenèse est la cytokine RANKL. Cependant, des études concernant les mécanismes mis en jeu dans l'activation de la formation osseuse par les cellules de la lignée ostéoclastique restent à ce jour relativement limitées. Certains auteurs suggèrent un contrôle de la formation osseuse via les ostéoclastes producteurs de BMP6 et de Wnt10b (78) et d'autres un contrôle bidirectionnel entre ostéoclastes et ostéoblastes via les molécules ephrinB2-Eph4 permettant l'arrêt de la résorption puis une stimulation de l'apposition (134).

Récemment, la compréhension des liens entre systèmes immunitaire et osseux a permis l'émergence d'une nouvelle discipline : l'ostéoinmunologie. À l'état physiologique, l'homéostasie entre ostéoclastes et ostéoblastes est assurée mais lors de certaines pathologies inflammatoires telles que la polyarthrite rhumatoïde une dérégulation associée à l'inflammation chronique est observée. Ainsi les lymphocytes T produisent des cytokines pro-inflammatoires contrôlant à la fois la formation et la résorption osseuse. Dans ce contexte, le rôle de la lignée monocyte / macrophage dans le contrôle de la formation osseuse à l'état physiologique a été mis en évidence par l'équipe d'Alison Pettit (116). Ils ont pu identifier une nouvelle population cellulaire au sein des BRC, les OsteoMacs. Ces OsteoMacs contrôlent la différenciation ostéoblastique à l'état basal mais stimulent également l'ossification intramembranaire lors de la réparation des fractures (142), posant ainsi cette nouvelle population de macrophages résidents comme une nouvelle cible pour les stratégies thérapeutiques visant à stimuler la consolidation osseuse. Cependant, si le rôle des OsteoMacs dans la biologie osseuse est certain, le(s) facteur(s) de couplage intervenant entre OsteoMacs et ostéoblastes n'a à ce jour pas été défini.

Connus pour leurs rôles dans l'immunité innée et adaptative, les macrophages, une fois activés par un ligand des TLR comme le LPS, acquièrent des propriétés anti-microbiennes et produisent de grandes quantités de médiateurs pro-inflammatoires comme le  $\text{TNF}\alpha$ , l'IL-6 ou des prostaglandines E2. Lors de la réparation des fractures, ces molécules sont capables de recruter et de stimuler la différenciation ostéogénique de MSC dérivées du muscle lésé (170). De plus, lors des phénomènes d'athérosclérose, les macrophages via la production de  $\text{TNF}\alpha$  et

d'OSM favorisent les calcifications vasculaires (130). Par conséquent, les macrophages semblent être des acteurs majeurs de la régulation de la formation osseuse physiopathologique et l'identification du ou des facteur(s) de couplage est requise.

Les cytokines de la famille de l'IL-6 comme l'OSM ou le LIF partagent au niveau de leur récepteur une sous-unité commune : la gp130. Ces cytokines sont impliquées dans différentes pathologies inflammatoires chroniques et sont produites par divers cellules immunitaires activées (lymphocytes T, neutrophiles ou monocytes / macrophages). Si le rôle de ces cytokines a surtout été décrit comme étant pro-ostéoclastique, des études montrent notamment que l'IL-6 (associée à son récepteur soluble IL-6R) ainsi que l'OSM stimulent la différenciation ostéoblastique et la minéralisation de la MEC via l'activation du facteur de transcription STAT3. Ces cytokines sont donc impliquées à la fois dans le contrôle de la résorption et de la formation osseuse et apparaissent donc comme de bons candidats en tant que facteurs de couplage faisant le pont entre les monocytes / macrophages et les cellules ostéoblastiques.

## B. Article scientifique

### **Induction of osteogenesis in mesenchymal stem cells by activated monocytes/macrophages depends on oncostatin M signaling.**

Guihard P, Danger Y, Brounais B, David E, Brion R, Delecric J, Richards CD, Chevalier S, Rédini F, Heymann D, Gascan H, Blanchard F.

*Stem Cells*. 2012 Apr;30(4):762-72. doi: 10.1002/stem.1040

La résorption osseuse, réalisée par les ostéoclastes, et la formation osseuse, réalisée par les ostéoblastes sont deux processus finement régulés permettant le remodelage osseux. Ces régulations impliquent différents facteurs ostéoactifs tels que des membres des familles du TNF, des BMPs ou des Wnt. Les récentes avancées en ostéoimmunologie ont permis de mettre en évidence le rôle de la lignée monocytes / macrophages dans le contrôle de la formation osseuse. Cependant, le ou les facteurs de couplage entre ces macrophages et les ostéoblastes n'ont à ce jour pas encore été décrits.

Grâce à des techniques de PCR à haut débit ainsi qu'à un panel d'anticorps neutralisants et d'inhibiteurs chimiques, nous avons identifié l'OSM, une cytokine appartenant à la famille de l'IL-6, comme étant un facteur de couplage majeur produit par les monocytes / macrophages humains circulants CD14<sup>+</sup> activés. L'OSM stimule l'expression de marqueurs ostéoblastiques (CEB/P $\delta$ , cbfa1 et ALP) dans des cellules souches mésenchymateuses, mais également leur différenciation en ostéoblastes (au dépens de la différenciation adipogénique), ainsi que la minéralisation de la MEC.

Après activation des TLRs à la surface des monocytes/macrophages par le LPS ou des ligands endogènes, l'OSM est produit par les macrophages inflammatoires M1 seulement et ce, de façon dépendante de la COX2 et des prostaglandines E2. La stimulation de la formation osseuse par ces monocytes / macrophages activés est inhibée par des anticorps ou des siRNA dirigés contre l'OSM, la gp130 ou l'OSMR (formant le récepteur de type II à l'OSM) mais également dirigés contre STAT3, le facteur de transcription majeur activé après fixation de l'OSM à son récepteur.

Le rôle présumé de l'OSM a été confirmé *in vivo*. La surexpression de l'OSM par injections intratibiales d'adénovirus codant cette cytokine induit une augmentation de la formation osseuse sans affecter la résorption osseuse chez la souris.

Par ailleurs, deux autres cytokines de cette famille de l'IL-6 ont également montré, mais dans une moindre mesure, un rôle dans la formation osseuse induite par des monocytes / macrophages activés : le LIF et l'IL-6.

Cette étude permet donc d'envisager que durant l'inflammation, une infection ou une fracture, les cytokines de la famille de l'IL-6 produites localement par les macrophages en site osseux stimulent la formation osseuse sans affecter la résorption osseuse. Cette voie apparaît donc comme une cible privilégiée pour de nouvelles approches thérapeutiques anaboliques.





























## C. Compléments de discussion

Dans cette étude nous avons mis en évidence la capacité des monocytes / macrophages à produire des facteurs de couplage capables de stimuler la formation osseuse induite par des MSC. Si les ostéoclastes induisent la formation osseuse via la BMP6 et Wnt10b (78), les lymphocytes T via le TNF $\alpha$ , le TGF $\beta$ , l'IFN $\gamma$  et l'IL-17 (341), la neutralisation de ces différents médiateurs dans nos modèles de culture cellulaire n'a pas eu d'effet inhibiteur sur la minéralisation induite par les surnageants de monocytes activés. En revanche, la neutralisation de la gp130, de l'OSM et, dans une moindre mesure du LIF, a permis d'inhiber significativement cette minéralisation. Nous avons donc pu démontrer que les monocytes activés par le LPS stimulent la différenciation des MSC ainsi que la minéralisation de la MEC via la production majoritairement d'OSM et selon un mécanisme COX2 / PGE2 dépendant. Il faut noter également que l'OSM est principalement produit par les macrophages M1 (polarisés avec l'IFN $\gamma$  *in vitro*), les macrophages M2a (polarisés avec l'IL-4) et M2c (polarisés avec l'IL-10) produisant très peu cette cytokine. Nous n'avons pas étudié les macrophages M2b polarisés avec les complexes immuns.

Nos résultats ont été appuyés très récemment par une étude de Nicolaidou et collaborateurs qui a montré que la lignée monocyte/macrophage pouvait en condition non-inflammatoire (c'est-à-dire sans stimulation par des LPS) induire la différenciation ostéogénique de MSC par une voie OSM / STAT3 / cbfa1 / ALP. Les contacts monocytes/MSC (via les Ephrines ?) induisent la sécrétion d'OSM par les monocytes et ainsi stimulent l'ostéogénèse. Ces résultats suggèrent que l'OSM serait une molécule de couplage entre les OsteoMacs et les ostéoblastes dans les BRC en condition physiologique, une hypothèse qui doit maintenant être validée *in vivo* (342).

Trois termes différents sont utilisés pour décrire le mode d'action d'une molécule ostéoactive. Les molécules ostéogéniques sont capables de stimuler de façon directe la production d'une matrice minéralisée ; les molécules ostéoinductrices ont la capacité de recruter des MSC naïves au niveau du site et d'initier leur différenciation ostéoblastique ; les molécules ostéoconductrices forment une structure tridimensionnelle permettant la vascularisation, le développement de la MEC et l'arrivée de différents contingents cellulaires favorisant ainsi la croissance osseuse. Nos modèles de cultures cellulaires *in vitro* ne faisant intervenir qu'un type cellulaire (les MSC) ainsi que des surnageants de monocytes activés, il semble établi que l'OSM joue ici un rôle de molécule ostéogénique. Cependant, les autres

composantes n'ont pu ici être évaluées et l'effet de l'OSM sur la chémoattraction des MSC naïves ainsi que sur la production d'une matrice tridimensionnelle doit être investigué. Dans ce contexte, Paul Moxham a montré en 2007 le rôle de l'OSM en tant que molécule ostéoinductrice dans des modèles de défauts osseux critiques au niveau de la calvaria de lapins (337). Cependant, il semble évident qu'une seule cytokine ne pourra être seule responsable du comblement d'un défaut osseux. Aussi, des modèles animaux examinant l'activité synergique de différentes molécules ostéoactives semblent requis. Des expériences préliminaires montrent par exemple un effet synergique entre l'OSM et des membres de la famille des BMPs sur l'ostéogenèse *in vitro* (296).

Lors de leur différenciation ou dans un contexte inflammatoire, les ostéoblastes produisent de nombreux médiateurs impliqués dans les trois types de régulations osseuses présentées ci-dessus. C'est le cas par exemple du VEGF qui est produit par les ostéoblastes en cours de différenciation et joue à la fois un rôle ostéogénique en stimulant la minéralisation de la MEC et un rôle ostéoinducteur en favorisant l'angiogenèse et donc le recrutement de précurseurs ostéoblastiques (242). De même, les MSC font partie intégrante du système immunitaire inné et sont capables de répondre à une stimulation par un produit bactérien tel que le LPS. En réponse à une stimulation via un ligand des TLRs, les MSC produisent de nombreuses chémokines dont CCL2, CCL3 ou CXCL2 induisant ainsi le recrutement et la différenciation des monocytes au niveau du site inflammatoire. De même, les LPS (ou des cytokines pro-inflammatoires) stimulent l'expression et l'activité de COX2 dans les MSC ceci conduisant à la production de PGE2 et à la polarisation des macrophages M2 producteur d'IL-10 (125) (voir Figure 18 et Figure 19). Dans cette étude, nous avons étudié, par RT-PCR à haut-débit, la régulation transcriptionnelle de 161 gènes codant toutes les cytokines, chémokines et facteurs de croissance dans des monocytes CD14<sup>+</sup> activés par le LPS. Il semblerait intéressant de réaliser des études transcriptionnelles additionnelles dans les MSC, par exemple après traitement LPS.

Bien que nous n'ayons pas été en mesure de détecter de production d'OSM dans les MSC / ostéoblastes que soit à un niveau transcriptionnel ou traductionnel, d'autres auteurs indiquent une production d'OSM par les ostéoblastes différenciés (264). Il semblerait donc important d'exclure pleinement un effet autocrine de l'OSM dans les MSC, pour cela des tests de minéralisation sur des MSC traitées par du LPS et associées ou non à des anticorps neutralisants l'OSM ou des siRNA pourraient être réalisés. L'hypothèse que nous favorisons actuellement est que certaines cultures primaires de MSC ou ostéoblastes décrites dans la littérature sont contaminées par des macrophages et donc expriment de l'OSM.

Dans cette étude, nous avons constaté que certains donneurs de monocytes (2 sur les 8 testés) produisaient de faibles quantités d'OSM en réponse à une stimulation LPS. De façon intéressante, la stimulation des MSC avec les surnageants de monocytes activés (qu'ils contiennent des quantités faibles ou fortes d'OSM) a entraîné la production de LIF par ces MSC, suffisante pour induire la minéralisation. Il s'agit probablement d'un effet compensatoire entre cytokines de la famille de l'IL-6 et on peut imaginer que les monocytes qui produisent peu d'OSM aient un phénotype particulier. Ces donneurs de monocytes pourraient par exemple être dans un statut inflammatoire particulier comme une augmentation de la population des monocytes « non-classiques » CD14<sup>+</sup> CD16<sup>++</sup> ou bien encore des monocytes en voie de différenciation vers les macrophages M2 moins producteurs d'OSM. Aussi, afin de confirmer cet effet donneur dépendant et de mieux le caractériser, un plus grand nombre de donneurs serait nécessaire.

Les macrophages étant une population cellulaire largement impliquée dans le développement des rhumatismes inflammatoires chroniques tels que la polyarthrite rhumatoïde (PR) ou les spondylarthrites ankylosantes (SPA), il serait également intéressant de caractériser de façon précise les sous populations macrophagiques productrices d'OSM dans ces différentes pathologies. En effet, ces pathologies si elles sont toutes les deux caractérisées par une inflammation chronique de la synovie, sont très différentes au niveau de leur conséquence osseuse. La PR entraîne l'apparition d'ostéolyses sévères ainsi qu'une baisse de l'efficacité des processus de réparation osseuse alors que la SPA est caractérisée par la présence de formations osseuses ectopiques entraînant dans les stades terminaux de la maladie une ankylose axiale ou périphérique. De façon intéressante, le groupe de Dominique Baeten a montré que la polarisation des macrophages était différente dans ces deux pathologies, les patients atteints de PR ayant un profil clairement M1 alors que les patient atteints de SPA expriment moins de cytokines M1 (IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IP-10), les taux de cytokines M2 étant comparables entre PR et SPA (TGF $\beta$ , IL-1RII, CCL18), suggérant un équilibre M1/M2 en faveur du M2 dans la SPA (343). De plus, une étude récente a montré qu'une population particulière de lymphocytes T CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> résidant dans les enthèses était activée par l'IL-23 dans la SPA, produisait des médiateurs inflammatoires tels que l'IL-6, l'IL-17, l'IL-22 et la CXCL1 pour induire l'ostéogenèse et la formation osseuse ectopique (344). Aucune donnée n'est actuellement disponible sur l'OSM dans la SPA, aussi il serait intéressant d'évaluer le rôle potentiel de cette cytokine en tant que molécule anabolique responsable, au moins en partie, des formations osseuses ectopiques observées dans cette pathologie.

Pour conclure, cette étude a permis de montrer que i) les macrophages M1 stimulés par un ligand des TLRs produisent de l'OSM, ii) que cette production est dépendante de la voie COX2 / PGE2, iii) que l'OSM stimule son récepteur de type II (gp130/OSMR) à la surface des MSC iv) entraînant l'activation du facteur de transcription STAT3, la différenciation ostéoblastique puis la minéralisation de la MEC. Par ailleurs, l'IL-6 semble également impliquée puisque l'ajout du récepteur soluble à l'IL-6 (absent de notre modèle *in vitro* à deux types cellulaires) permet de stimuler la minéralisation par les MSC, l'IL-6 pourrait donc être impliquée *in vivo* et son récepteur soluble serait fourni par d'autres types cellulaires comme les hépatocytes par exemple. En plus d'un effet indirect, le LPS semble également exercer des effets directs sur les MSC via la production de LIF et d'IL-6 par les MSC, ces deux cytokines exerçant alors des effets autocrines (Figure 28). Par conséquent, nous pouvons envisager que lors d'une inflammation, une infection ou atteinte mécanique localisées à l'os, ces cytokines de la famille de l'IL-6, produites en partie par les macrophages activés, sont capables de stimuler la (re)formation osseuse sans stimulation excessive de sa résorption. Elles apparaissent alors comme étant de bonnes cibles pour de nouvelles stratégies thérapeutiques anaboliques. Bien que le rôle anabolique de l'OSM ait été démontré par surexpression chez l'animal, il semble désormais nécessaire d'étudier la production d'OSM endogène et son rôle dans différents contextes physiopathologiques.

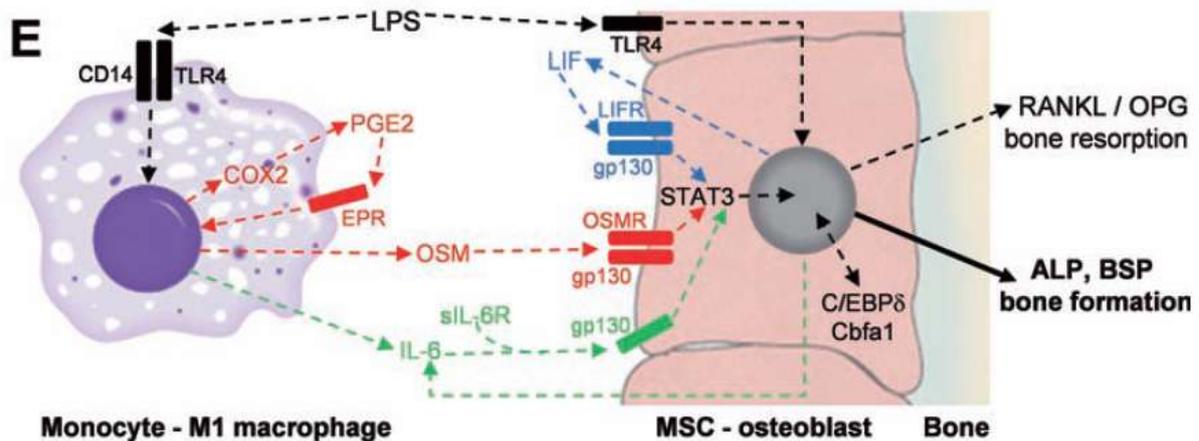


Figure 28 : représentation schématique du couplage entre monocytes / macrophages activés et MSC / ostéoblastes. D'après (334)

**PARTIE II :**  
**Réparation d'un défaut osseux non-**  
**critique chez la souris déficiente en**  
**OSM**

## A. Introduction

Durant ces dernières années, la disponibilité grandissante d'animaux génétiquement modifiés a permis le développement de nouvelles expérimentations animales dans lesquelles le rôle précis d'un gène en particulier peut être investigué. De façon surprenante, une grande partie de ces animaux ne possède pas ou peu de phénotype particulier à l'état physiologique, en revanche, ces animaux répondent très différemment des animaux sauvages lorsqu'ils sont confrontés à des conditions pathologiques. C'est le cas par exemple des modèles de défauts osseux qui font intervenir de nombreux gènes selon une cinétique d'expression précise. Cependant, les stratégies thérapeutiques visant à améliorer la qualité et la vitesse de la réparation des fractures ne sont encore que partiellement efficaces. Quelques thérapies sont disponibles dans le but de stimuler la réparation osseuse, ces traitements ciblent en particulier les cellules de la BMU afin de modifier l'équilibre formation / résorption osseuse en faveur de la formation. Malheureusement, la plupart de ces thérapies dites anti-résorptives ciblent les ostéoclastes producteurs de facteurs de couplage ostéogéniques. Par conséquent, ces traitements ne sont que peu efficaces dans la consolidation de fractures. C'est le cas notamment des bisphosphonates, donnés très largement aux femmes ostéoporotiques, qui, du fait de leur très longue demi-vie en site osseux sont délétères pour les stratégies anaboliques actuelles (343). A l'inverse, la PTH est capable de stimuler la formation osseuse mais à long terme elle induit également la résorption (178). Il est donc nécessaire de mettre en évidence des moyens de stimuler la formation osseuse de façon totalement indépendante de la résorption osseuse.

Le processus selon lequel la résorption osseuse entraîne l'activation de la formation osseuse par les ostéoblastes est nommé le remodelage osseux. Ce phénomène a lieu au sein des BMU et permet le remplacement du tissu osseux défectueux mais également de maintenir l'intégrité du squelette. A l'inverse, le modelage osseux permet la formation ou la résorption osseuse mais cette fois sans la présence d'un couplage strict entre ces deux mécanismes. Le modelage osseux est activé après une modification des contraintes mécaniques ou une fracture conduisant à une stimulation de la formation osseuse et/ou de la résorption osseuse en différents sites anatomiques.

Afin d'assurer l'homéostasie osseuse, le système immunitaire, et plus particulièrement la lignée des monocytes / macrophages, est capable de réguler finement ces deux processus que sont le modelage et le remodelage osseux. Cela a tout d'abord été démontré par les

travaux de Chang et al, qui ont montré en 2008 que les macrophages possèdent une nouvelle fonction tissu spécifique dans le microenvironnement osseux : ils réguleraient la capacité des ostéoblastes à produire une matrice et à la minéraliser. Ils ont nommé ces Macrophages osseux, OsteoMacs en référence aux autres cellules osseuses (116). Puis en 2011, le même groupe a publié des résultats complémentaires. Ils ont démontré la présence et l'implication de ces OsteoMacs durant les phénomènes d'ossification intramembranaire dans des modèles de défauts osseux chez la souris. La déplétion locale ou systémique des macrophages entraîne un délai dans la réparation osseuse ainsi qu'une apposition osseuse défectueuse. A l'inverse, une stimulation de la population macrophagique par du M-CSF augmente la présence d'OsteoMacs au niveau du site lésé et favorise l'apposition osseuse (142). Cependant, ces deux études, si elles mettent en évidence un couplage entre OsteoMacs et ostéoblastes, n'ont pas permis de définir la nature du ou des facteur(s) de couplage impliqué. Nos travaux (334) et ceux de Nicolaidou *et al.* (342) ont permis de montrer *in vitro* que les monocytes / macrophages pouvaient sous certaines conditions produire des cytokines ostéogéniques, et plus particulièrement l'OSM, capable de stimuler la différenciation de précurseurs ostéoblastiques ainsi que la minéralisation de la MEC. *In vivo*, la sur-expression locale de l'OSM (protéine recombinante, thérapie génique adénovirale, souris transgéniques) entraîne des appositions osseuses périostées ou médullaires au niveau des os longs, un épaissement de la calvaria et le comblement d'un défaut osseux critique dans la calvaria (296,337). Cependant, l'implication de l'OSM endogène dans les processus de réparation osseuse ainsi que sa production par les macrophages osseux n'a, à ce jour, pas été évaluée *in vivo*. Aussi, les objectifs de cette étude sont de vérifier l'expression et l'implication de l'OSM dans des modèles de défauts osseux chez la souris sauvage en comparaison avec des souris déficientes pour l'OSM (KO).

Cette cytokine de la famille de l'interleukine 6 est produite par de nombreuses cellules dont les cellules hématopoïétiques et fibroblastiques et joue un rôle majeur dans le développement hépatique et l'hématopoïèse (305). L'OSM est également produite par les lymphocytes Th1 et les cellules dendritiques, suggérant donc un rôle dans le contrôle de l'immunité (289,345). La première équipe à avoir mis au point des souris déficientes en OSM est le groupe du Dr. Atsushi Miyajima de l'université de Tokyo. En 2004, ils ont pu montrer que l'OSM exerce un rôle central dans la mise en place post-natale des voies neuronales capables de détecter des signaux nociceptifs (307). Parallèlement à ces travaux, ils ont montré l'implication de l'OSM dans le développement des macrophages thymiques responsables de l'évacuation des thymocytes ayant subi la sélection négative (345). Les souris OSM-/-

souffrent d'hypoplasie thymique associé à une accumulation de thymocytes immatures et d'anticorps autoimmuns, suggérant ainsi l'implication de l'OSM dans la prévention de pathologies autoimmunes (347). L'équipe de N. Sims a publié que les souris OSMR<sup>-/-</sup> (récepteur pour l'OSM mais également pour l'IL-31) étaient ostéopétrotiques avec diminution à la fois de la formation et de la résorption osseuse (264), mais aucune étude n'a à ce jour porté sur le phénotype osseux des souris OSM<sup>-/-</sup>. De plus, les souris OSM<sup>-/-</sup> ou OSMR<sup>-/-</sup> n'ont jamais été utilisées pour étudier les différents processus de cicatrisation osseuse.

Dans un premier temps, nous avons évalué le phénotype osseux des souris OSM<sup>-/-</sup>. Dans un deuxième temps, après création d'un défaut osseux non critique dans le tibia, nous avons étudié la production de l'OSM et la cinétique de réparation osseuse par microscanner, histologie et immunohistochimie en comparaison avec des animaux sauvages. Cette étude est encore préliminaire et sera étendue ensuite aux souris OSMR<sup>-/-</sup> disponibles au laboratoire.

## **B. Matériels et méthodes**

### **1. Elevage des souris OSM -/-**

Toutes les études présentées ici ont été approuvées par le comité national de réflexion éthique sur l'expérimentation animale. De plus, les expérimentations sont réalisées par des personnes ayant suivi la formation à l'expérimentation animale de niveau I au sein l'Unité de Thérapeutique Expérimentale de l'Université de Nantes.

#### **11. Développement des souris déficientes en OSM**

Les souris OSM -/- ont été obtenues grâce à une collaboration avec le Dr. Miyajima (Wakayama Medical University, Japon). La description précise de ces souris est présentée en référence (307).

Pour nos expérimentations, nous avons utilisé des souris de 3<sup>ème</sup> génération de fond génétique C<sub>57</sub>Bl/6. Tout d'abord, les souris mâles OSM-/- obtenues par collaboration ont été croisées avec des souris femelles C<sub>57</sub>Bl/6 sauvages (élevage Janvier ®, France). Puis les souris de première génération hétérozygotes ont été à nouveau croisées avec des souris sauvages afin d'obtenir 25% de souris hétérozygotes qui ont été croisées entre elles afin d'obtenir des souris de 3<sup>ème</sup> génération (25% WT ; 25% KO et 50 % hétérozygotes). Ces souris de 3<sup>ème</sup> génération sont ensuite génotypées avant de pouvoir être utilisées.

#### **12. Génotypage**

Les souris âgées d'un mois sont anesthésiées avec un mélange O<sub>2</sub>-Isoflurane (2,5% Isoflurane Forène®, débit d'O<sub>2</sub> 2L/min, vaporisation en chambre d'inhalation). Pour chacune des souris, un fragment de 0,5 cm à l'extrémité de la queue est prélevé à l'aide d'une lame de scalpel stérile et placé dans un tube eppendorf. Deux cent µL de « Direct PCR (Tail) : Lysis reagent for genotyping using crude lysates » (Viagen Biotech ®) sont alors ajoutés à chaque tube. Les protéines sont ensuite digérées par une endopeptidase : la protéinase k (20mg/mL,

Sigma p6556®). Les échantillons sont placés 5 heures à 55°C, 15 minutes à 85°C puis peuvent être congelés avant de réaliser la PCR.

Deux couples de primers sont utilisés pour la PCR : un couple pour amplifier le gène de l'OSM (OSM sens : CAAGGGAACCCGCAGAATCTG ; OSM antisens : TGAATCAGCTTGTGTCATCAG) et un pour amplifier la cassette NEO (Neo sens : GAACAAGATGGATTGCACGCAG ; Neo antisens CCATGATATTCGGCAAGCAG) insérée lors de la transgénèse. La PCR est réalisée par ajout de 19,6µL de mélange réactionnel et 0,4µL d'ADN génomique obtenu précédemment. Le mélange réactionnel PCR préparé présente la composition suivante :

- 0,4µL de dNTP 200µM (Eurogen Tech®)
- 0,6µL de MgCl<sub>2</sub> 50mM (Kit EurobioTaq®)
- 2µL de tampon de réaction 10X (Kit EurobioTaq®)
- 0,4µL de TAQ polymérase 1U (Kit EurobioTaq®)
- 0,4µL de chaque oligonucléotide (OSM et Neo sens, antisens) 10pmol/µL (Invitrogen®)
- Eau RNase, DNase free (Macherey-Nagel®) qsp 19,6 µl.

La PCR est ensuite réalisée selon le protocole suivant : 2 minutes à 95°C suivi de 30 cycles de 30 secondes à 94°C, 60 secondes à 59°C et 60 secondes à 72°C, puis une étape d'élongation finale de 10 minutes à 72 °C.

Après migration par électrophorèse les amplicons sont observés, pour les souris WT une bande à 420 paires de base, pour les souris KO une bande à 585 paires de base et pour les animaux hétérozygotes les deux bandes.

Pour toute les manipulations présentées ici, nous utiliserons des souris sauvages et KO exclusivement issues de croisement entre des souris hétérozygotes OSM +/-.

## 2. Modèles de défaut osseux

Afin de réaliser un suivi de la réparation osseuse chez les animaux, la chirurgie a été réalisée chez des souris de 7 semaines (mâles ou femelles), anesthésiées par inhalation d'un mélange O<sub>2</sub> / isoflurane. Rapidement, la peau a été incisée à la face médiane antérieure du tibia gauche, puis le muscle a été dilacéré sur 1 cm afin de mettre l'os à nu. Un trou de 1 mm de diamètre a ensuite été percé au niveau diaphysaire proximal (4-6 mm de la plaque de

croissance) à travers la corticale et dans l'os trabéculaire à l'aide d'un micro-moteur chirurgical (Surgic XT, NSK). Deux points de suture sont réalisés, accompagnés d'une injection intramusculaire d'un dérivé morphinique (Buprécare) dans la patte controlatérale (cette injection est répétée le lendemain de l'intervention).

### 3. Analyse de l'architecture osseuse

Les paramètres architecturaux ont été analysés grâce au système haute résolution à rayons X micro CT (SkyScan, Aartselaar, Belgique). Le volume osseux rapporté au volume total sélectionné (BV/TV : Bone Volume / Tissu Volume), l'épaisseur des travées osseuses (Tb.Th : Trabecular Thikness.) et le nombre de travées osseuses (Tb. N : Trabecular Number) ont ensuite été quantifiés grâce aux logiciels nRecon (reconstruction 3D) et CTan (calculs des volumes osseux).

Pour l'analyse du phénotype osseux des souris OSM -/- en comparaison avec les souris WT, les mesures ont été réalisées sur le tibia droit d'animaux de 7 semaines et au niveau de l'os spongieux secondaire sur 3 mm sous la plaque de croissance et en excluant l'os cortical.

Pour l'analyse comparative de reconstruction osseuse après création du défaut osseux, les paramètres architecturaux ont été mesurés à J3, J5, J7, J9 et J14 après la chirurgie et sur des animaux anesthésiés par une injection intra-péritonéale d'un mélange Ketamine/Xilazine. La région d'analyse osseuse correspond au trajet du foret ayant permis la création du défaut osseux, c'est-à-dire un cylindre de 1 mm de diamètre.

### 4. Histologie

Des animaux ont été sacrifiés à J3, J7 et J14, puis les pattes ont été prélevées et fixées grâce à une solution de formaldéhyde 10% durant 24h. Après fixation, les pattes ont été décalcifiées dans un « KOS Microwave Histostation » (Milestone®) grâce à une solution de PBS contenant 4,13% d'EDTA et 0,2% de paraformaldéhyde. Après décalcification, les échantillons sont déshydratés puis inclus en paraffine. Des coupes sériées de 4 µm d'épaisseur sont effectuées avec un microtome Leica® RM2255.

Toutes les acquisitions (histologie et immunohistochimie) ont été obtenues à l'aide du scanner de lames Nanozoomer 2.ORS Hamamatsu®.

## 41. Coloration histologique

Les colorations ont été réalisées grâce à un automate de coloration (Microm® HMS 740) dans lequel les échantillons sont déparaffinés puis réhydratés par passage dans des bains de toluène puis d'éthanol de concentration décroissante.

Pour le trichrome de Masson (révélant notamment les fibres de collagène de l'os décalcifié en vert), les lames sont ensuite colorées selon le protocole indiqué dans le Tableau 3.

Tableau 3 : Protocoles de coloration histologique trichrome de Masson

TRICHOME DE MASSON	
SOLUTION	TEMPS
Hématoxyline de Groat	15 min
Eau distillée	5 min
Fuchsine acide-Ponceau	5 min
Eau acétifiée 1%	10 sec
Orange G molybdique	5 min
Eau acétifiée 1%	10 sec
Vert lumière	5 min
Eau acétifiée 1%	10 sec
Alcool 100°	30 sec
Alcool 100°	30 sec
Toluène	1 min
Toluène	1 min

Pour la coloration au bleu Alcian (révélant les glycosaminoglycanes sulfatés du tissu cartilagineux en bleu), après avoir déparaffiné puis réhydraté les échantillons, les lames sont immergées dans une solution de bleu Alcian à pH 2,5 (préalablement filtrée) pendant 30 min. Puis, une contre-coloration nucléaire est réalisée grâce un bain de 10 min dans du rouge nucléaire/Kernechtrot. Enfin, les lames sont déshydratées par des bains successifs d'alcool de degrés croissants avant d'être immergées dans un bain de toluène puis montées entre lame et lamelle grâce à un produit de montage non aqueux.

Pour la coloration histo-enzymologique TRAP (révélant les ostéoclastes), les lames sont également déparaffinées puis réhydratées avant d'être colorées pendant 90 min par la solution présentée ci-dessous et à 37°C, pour 60 ml :

- 60mg de naphтол AS-TR phosphate de disodium (Sigma®)
- 300µL de N-N diméthylformamide (Sigma®)

- 60mL de tampon acétate à pH 5,2 (acide acétique glacial à 0,2M et acétate de sodium à 0,2M)
- 1,38g de sodium tartrate (Sigma®)
- 60mg de Fast red TR salt (Sigma®)

Une contre-coloration à l'hématoxyline de Mayer est ensuite réalisée.

Après ces colorations, les lames sont montées entre lame et lamelle grâce à un produit de montage non aqueux, Pertex Histolab®.

## 42. Immunohistochimie

Pour toutes les colorations immunohistochimiques, le principe général est le même. Les tissus sont incubés sur lame avec un anticorps primaire spécifique de la protéine étudiée (F4/80 ou ostérix), cet anticorps primaire est ensuite détecté par un anticorps secondaire biotinylé. Puis, le signal est amplifié grâce à la liaison d'une streptavidine couplée à une HRP (Horse Raddish Peroxidase). Enfin, la révélation est permise par la solution AEC (3-Amino-9-EthylCarbazole) : le substrat de la HRP (les peroxydases ont été neutralisées par l' $H_2O_2$  pendant 10 min). Puis, une contre-coloration hématoxyline de Mayer est réalisée. Pour finir, le montage entre lame et lamelle est réalisée grâce à une solution de montage en solution aqueuse : Faramount Aquaeous Mounting Medium (Dako®). Entre chacune de ces étapes, 3 lavages de 5 min sont réalisés par une solution de PBS / Tween 0,1%. Pour chaque coloration immunohistochimique, les concentrations et temps d'incubation des anticorps et réactifs sont présentés ci-après.

Ostérix (révélant les pré-ostéoblastes et ostéoblastes matures):

- *Anticorps primaire* : « polyclonal rabbit anti-mouse osterix » (ab22552 ; Abcam) ; dilué au 1/800<sup>ème</sup> et incubé sur la nuit et à 4°C
- *Anticorps secondaire* : « Polyclonal Goat Anti-Rabbit Immunoglobulins / Biotinylated » (E0432 ; Dako) dilué au 1/200<sup>ème</sup> et incubé durant 30 min à 37°C
- *Streptavidine / HRP* : dilué au 1/200<sup>ème</sup> et incubé durant 30 min à 37°C (P0397 ; Dako)

#### F4/80 (révélant les macrophages):

- *Démasquage antigénique* : protéinase k diluée au 1/2000<sup>ème</sup> en PBS, 10 minutes à 37°C.
- *Anticorps primaire* : «monoclonal rat anti-mouse F4/80 » (MCA497 ; AbdSerotec) ; dilué au 1/200<sup>ème</sup> et incubé 1 heure à température ambiante.
- *Anticorps secondaire* : « Polyclonal Rabbit Anti-Rat Immunoglobulins / Biotinylated » (E0468 ; Dako) dilué au 1/100<sup>ème</sup> et incubé durant 30 min à 37°C
- *Streptavidine / HRP* : dilué au 1/100<sup>ème</sup> et incubé durant 30 min à 37°C (P0397 ; Dako)

## 5. Analyse transcriptionnelle de l'expression de l'OSM

Afin d'analyser l'expression génique de l'OSM dans et autour du défaut, l'ARN est extrait d'un fragment du tibia d'environ 0.5 cm de long et contenant le défaut osseux et les tissus environnants (muscle notamment). Ce fragment a ensuite été broyé à froid en solution de TRIzol ® (Invitrogen) à l'aide d'un disperseur DI25 (IKA, Staufen, Allemagne). Pour chaque temps étudié (sauf J14 où n=1) l'analyse a été réalisée sur deux animaux.

### 51. Extraction d'ARN

Les ARN totaux ont été extraits à l'aide du réactif TRIzol® suivant le protocole préconisé par le fournisseur. Brièvement, les ARN ont été isolés, après lyse cellulaire, dans la phase aqueuse de la solution TRIzol®/chloroforme. Les ARN ont ensuite été précipités puis lavés par de l'isopropanol absolu et de l'éthanol 75%. Le culot d'ARN a finalement été repris dans 20 µL d'eau DNase et RNase free (Braun).

## 52. Reverse Transcription

La production d'ADN complémentaire (ADNc) par transcription inverse a été effectuée avec des oligonucléotides « Oligo(dT)<sub>20</sub> » (50 pmoles/réaction) fournis dans le kit ThermoScript RT-PCR System (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). 1µg d'ARN total est mis en présence de 1µL d'Oligo(dT)<sub>20</sub>, de 2µL de dNTPs 10mM (1mM final) et d'eau afin d'obtenir un volume final de 12µL. Ce mélange a été chauffé 5min à 65°C avant d'ajouter 4µL de tampon de réaction 5X (concentrations finales : 50mM TRIS acétate, 75mM d'acétate de potassium et 8mM d'acétate de magnésium), 1µL de DTT 0,1M (5mM final), 1µL de RNase OUT à 40U/µL (2U/µL final), 1µL d'eau et 1µL de ThermoScript à 15U/µL (0,75U/µL final). Le volume final est de 20µL. La réaction est réalisée à 50°C pendant une heure puis arrêtée par chauffage à 85°C pendant 5 minutes.

## 53. PCR quantitative (Polymerase Chain Reaction)

Les expériences de PCR quantitative ont été réalisées à l'aide de l'appareil CFX96 de Biorad permettant de travailler avec des plaques 96 puits. Dans chaque puits, 10ng d'ADNc sont déposés ainsi que 8µL du mix [IQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad) et des primers sens et anti-sens du gène de l'OSM (300nM)]. Les séquences des primers utilisés sont sens : 5'TGCTCAGTTTGACCCTCAGTC3' et anti-sens : 5'GGCGGATATAGGGCTCCAAG3'. Les gènes de référence Hprt1 (Hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase 1) et Cyc1 (Cytochrome c-1) sont utilisés pour analyser les différences d'expression potentielles selon la méthode décrite par Vandesompele et al. (346).

## 6. Analyses statistiques

Les résultats ont été analysés par un test t grâce aux logiciels GraphPad InStat v3.02 et Prism3. Ils sont présentés sous forme de moyenne +/- SEM et sont considérés significatifs quand  $p < 0,05$ . (\*= $p < 0,05$ ).

## C. Résultats

### 1. Phénotype osseux des souris OSM -/-

A la naissance et jusqu'à 3 mois d'âge, nous n'avons pas observé de différences particulières quant à la taille ou au poids des animaux OSM -/- en comparaison avec les animaux sauvages d'une même fratrie. Après la fin de la croissance, à l'âge de 7 semaines, nous n'avons pas observé de différence significative de la longueur des tibias ou des fémurs entre les deux groupes et dans les 2 sexes. De même, la plaque de croissance est d'épaisseur et de taille identique chez ces animaux (non montré). Nous avons également étudié la microarchitecture osseuse de ces animaux de façon plus précise grâce au microscanner. Cette étude a porté sur des souris males exclusivement, les femelles étant en nombre insuffisant. Encore une fois aucune différence significative n'a pu être mise en évidence entre les souris sauvages et les souris déficientes en OSM (seule une tendance pour un os plus ostéopérotique est notée chez les animaux OSM-/-). En effet, nous avons mesuré le premier paramètre pouvant classiquement varier lors des atteintes osseuses, le volume osseux trabéculaire relatif (BV/TV), et il était équivalent dans les deux groupes. Pour les autres paramètres trabéculaires comme le nombre (Tb.N), l'épaisseur (Tb.th) ou l'espacement (Tb.sp), l'observation est la même : nous n'observons pas de différences significatives entre les groupes déficients en OSM et sauvage.

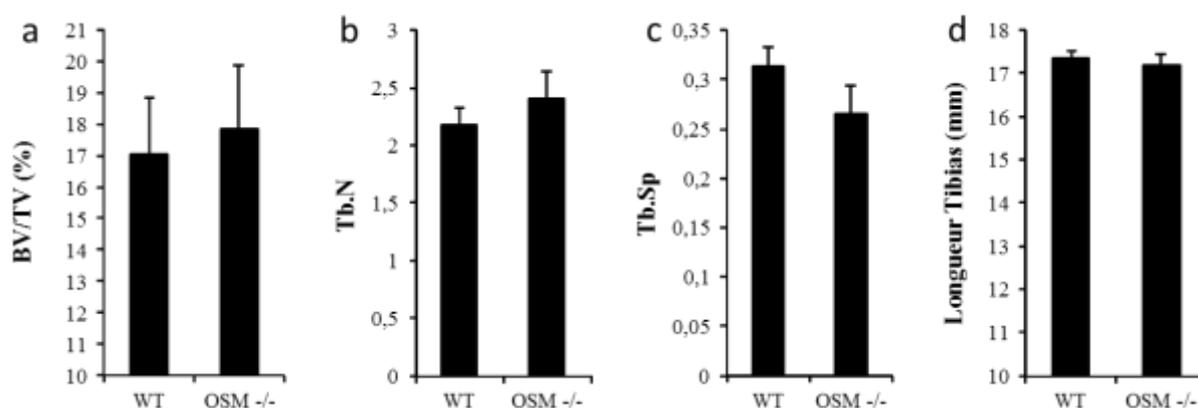


Figure 29 : analyse de la microarchitecture osseuse des souris males OSM -/- (a) BV/TV trabéculaire (b) Tb.N (c) Tb.Sp (d) longueur des tibias. WT, n=7 ; OSM-/-, n=6. Résultats présentés sous forme de moyenne +/- SEM.

## 2. Le transcrit OSM est surexprimé dans le défaut osseux

L'expression locale de l'OSM dans le défaut a été mesurée par RT-PCR. Il apparaît alors que le gène de l'OSM est rapidement surexprimé, une augmentation de près de 8 fois étant observée au temps précoce de 8h (en comparaison avec le contrôle sans chirurgie). Cette rapide et forte induction corrèle avec la mise en place de la phase inflammatoire et le recrutement des cellules effectrices de l'inflammation nécessaires à la cicatrisation (macrophages, neutrophiles etc). A J3, l'expression de l'OSM chute pour atteindre un taux de l'ordre de 2 fois le contrôle observé dans les tibias sans défaut (=J0). L'expression de l'OSM reste ensuite constante (Figure 30 A). Nous avons également étudié les marqueurs ostéoblastiques cbfa1 (Figure 30 B) et BSP (Figure 30 C). Il apparaît que la chirurgie entraîne la surexpression de cbfa1 dès J3 pour atteindre un plateau à J5 alors que la BSP, marqueur plus tardif, est surexprimé à partir de J5 pour atteindre une induction de 50 fois à J7 et retourner à la normale à J14.

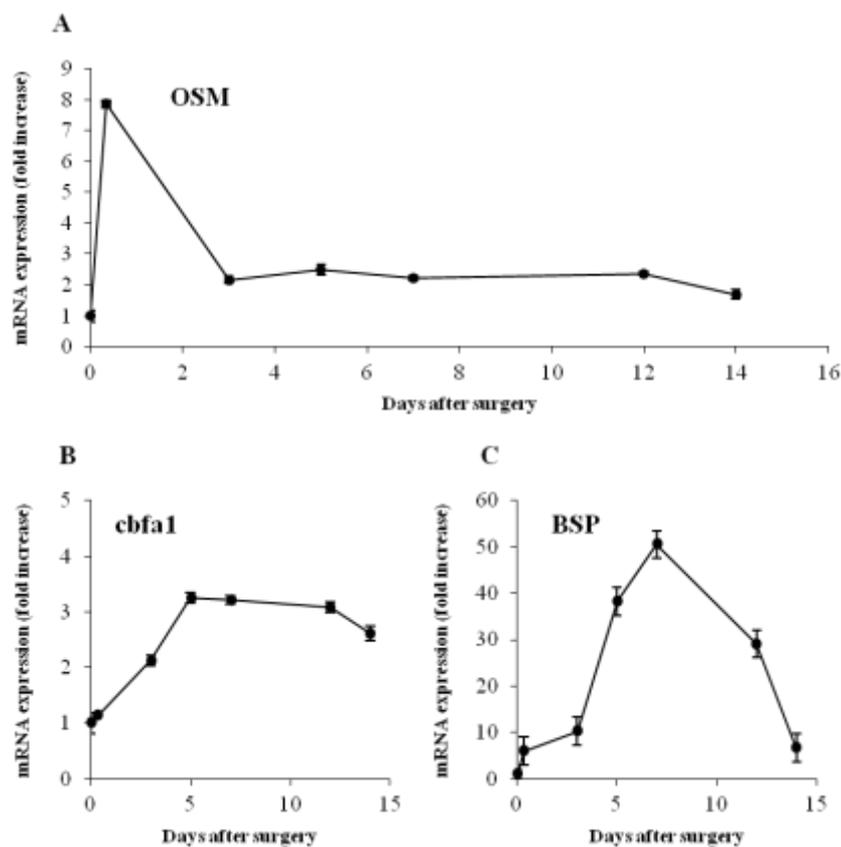


Figure 30 : Expression locale de l'ARNm codant (A) l'OSM (B) cbfa1 et (C) la BSP dans le défaut et après la chirurgie (l'expression est mesurée en comparaison avec le contrôle représenté par J0)

### 3. L'absence d'OSM entraîne un retard de réparation osseuse médullaire

Dans cette étude, nous avons utilisé la technique du microscanner pour évaluer l'impact de l'absence d'OSM sur la (re)formation osseuse, après création d'un défaut osseux cortical et médullaire de taille non critique. Cette technique étant non invasive pour les animaux, nous avons pu réaliser un suivi des paramètres osseux après création du défaut et durant 14 jours. Cette analyse a été réalisée sur des souris mâles et femelles, aucune différence entre les 2 sexes n'ayant été mise en évidence.

Pour les animaux sauvages, et grâce aux reconstructions 3D des tibias, nous pouvons constater que 3 jours après la création du défaut, le diamètre de ce dernier est toujours de 1 mm (non montré). Cela est confirmé par l'analyse du BV/TV qui, à ce temps et chez ses animaux, est proche de zéro si l'on considère une région d'intérêt correspondant au défaut originel. En revanche, dès J5, nous pouvons constater que le défaut médullaire commence à être comblé par des tissus minéralisés pour atteindre, 7 jours après la chirurgie, un BV/TV d'environ 45% (Figure 31 a). Cependant, à ces temps, l'os cortical est encore interrompu (Figure 31 b). Enfin, 14 jours après la chirurgie, les reconstructions 3D montrent une corticale à nouveau reformée, de plus il semble que la zone médullaire présente moins de tissu minéralisé qu'à J7. L'analyse du BV/TV total (médullaire + cortical) confirme cette hypothèse puisque celui-ci est inférieur au BV/TV observé à J7, l'os cortical a donc été formé en même temps que le médullaire a été en partie résorbé.

Si l'on compare les animaux déficients en OSM avec les animaux sauvages, on ne constate pas de différences significatives à J3. A J5, un certain retard semble apparaître chez les animaux KO, cependant l'analyse n'ayant pu être faite que sur un seul animal à ce temps nous ne pouvons tirer aucune conclusion.

En revanche, à J7, l'analyse du BV/TV a été réalisée sur un nombre suffisant d'animaux (n=10 pour les animaux WT et n=6 pour les animaux KO). Nous observons alors que le BV/TV de la zone d'intérêt est significativement inférieur chez les animaux KO en comparaison avec les animaux sauvages (en moyenne, BV/TV de 45% vs 20% chez les animaux OSM -/-). Cette observation est d'ailleurs confirmée par les reconstructions 3D, où il apparaît que les souris déficientes en OSM souffrent d'un retard de formation osseuse médullaire. Cette observation semble se confirmer à J9, cependant comme pour J5, le faible nombre d'animaux dans le groupe OSM -/- ne nous permet pas de conclure.

Enfin, à J14, le BV/TV de la zone d'intérêt est statistiquement identique dans les deux groupes, 50% chez les souris OSM  $-/-$  comme chez les souris WT (n=8 pour les animaux WT et n=4 pour les animaux KO). De plus, les reconstructions 3D permettent de voir que la corticale est reformée dans les deux groupes et ce malgré le retard de formation osseuse médullaire observé pour les animaux OSM  $-/-$  à J7 (Figure 31 a et b).

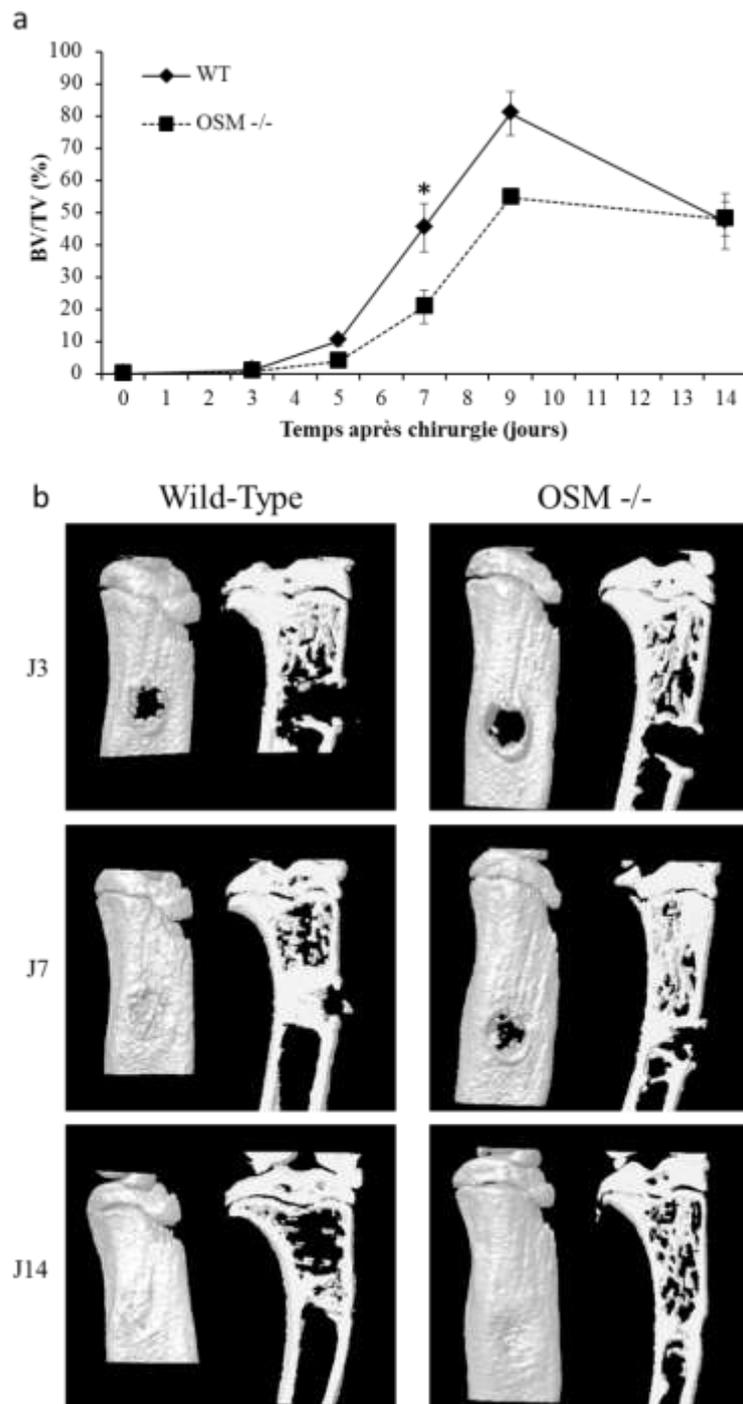


Figure 31 : Cinétique de reconstruction osseuse après création d'un défaut non critique ; analyse de la microarchitecture osseuse par microscanner. (a) évolution du BV/TV durant 14 jours après la chirurgie (moyenne  $\pm$  SEM). (b) reconstruction 3D à J3, J7 et J14. \* =  $p < 0.05$

## 4. Analyse histologique préliminaire

Afin d'avoir une analyse plus précise des différents types cellulaires impliqués dans la reconstruction osseuse après formation du défaut, nous avons, dans un second temps, réalisé une analyse par histologie et immunohistochimie des tibias lésés à différents temps et dans les deux groupes. Cependant, du fait du faible nombre d'animaux (n=1 à J3 ; n=2 à J7 et J14 dans chaque groupe), cette analyse reste très préliminaire et devra nécessairement être complétée par de nouvelles expérimentations (Figure 32 et Figure 33).

*A J3 tout d'abord*, la coloration au Trichrome de Masson nous permet de différencier l'os cortical et la région médullaire lésés ainsi que la moelle osseuse (respectivement Co, Me et Mo). Cette coloration permet également de mettre en évidence la présence d'un hématome. Ce dernier apparaît identique dans les deux groupes. Enfin, on relève également la présence d'un cal inflammatoire (noté Ca). Il serait d'ailleurs intéressant de mesurer la surface de ce cal dans les deux groupes malheureusement cela nous a été impossible du fait du faible nombre d'animaux. Ce dernier est d'ailleurs mieux identifiable grâce à la coloration au bleu Alcian qui permet de mettre en évidence les tissus cartilagineux et fibro-cartilagineux (qui apparaissent en bleu ; l'os mature étant rose pâle ; et les cellules de la moelle osseuse en rose). Chez les animaux WT, il semble que ce cal soit de nature plus fibro-cartilagineuse que chez les animaux KO. Ensuite, afin d'évaluer la présence de macrophages recrutés (=inflammatoires) ou résidents (=OsteoMacs), nous avons réalisé une coloration immunohistochimique pour le marqueur F4/80. A J3, comme décrit dans la littérature, le marquage nous permet de mettre en évidence, dans les deux groupes, des cellules positives à proximité de l'endoste (flèche Figure 32 et non montré) (116). En revanche, on ne retrouve pas de cellules F4/80<sup>+</sup> dans le tissu cicatriciel (cal et hématome) et, ce dans les deux groupes. Puis, nous avons étudié les cellules osseuses, ostéoblastes et ostéoclastes via respectivement un marquage immunohistochimique ostérix et une coloration révélant l'activité TRAP. Pour ces deux marquages et dans les deux groupes, on ne relève pas de cellules positives dans le tissu cicatriciel. En revanche, des cellules ostérix positives sont présentes en périphérie de la lésion au niveau de l'endoste et du périoste qui pourraient représenter une source précoce pour ces cellules (représenté par des flèches sur les Figure 32 et Figure 33). Des ostéoclastes sont visibles en périphérie également au niveau des débris osseux provoqués par la lésion.

*A J7 ensuite*, le trichrome de Masson permet de mettre en évidence de l'os médullaire nouvellement formé (noté Me) en lieu et place de l'hématome qui apparaît totalement résorbé.

Cet os nouvellement formé comble presque entièrement l'espace médullaire et ce dans les deux groupes, cependant, il semblerait qu'il soit plus immature pour les animaux KO, ce qui est supporté par l'observation faite avec les analyses par microscanner. De plus, la corticale n'est, à ce temps, pas encore reformée dans les deux groupes. La coloration au bleu Alcian semble indiquer que le cal est à nouveau de nature plus fibro-cartilagineuse chez les animaux WT, de même, l'os médullaire nouvellement formé apparaît plus bleu pour les animaux WT suggérant donc un mode d'ossification à partir de fibro-cartilage. L'immunomarquage F4/80 montre pour les animaux WT comme OSM  $-/-$ , une prolifération (ou une chémoattraction) de macrophages. Au niveau de la future corticale, les macrophages sont regroupés dans une zone entourée d'ostéoblastes ou pré-ostéoblastes. Au niveau de l'ostéoïde médullaire, les macrophages se retrouvent également à proximité voir au contact des ostéoblastes. De plus, si la répartition des ostéoblastes semble équivalente dans les deux groupes, il semblerait que le nombre de ces cellules soit inférieur chez les animaux KO. Enfin pour les ostéoclastes, bien que, comme pour les autres colorations, nous n'ayons pas pu effectuer de comptage précis, il semblerait que la répartition et le nombre soient identiques dans les deux groupes : les ostéoclastes sont présents au contact de l'os médullaire nouvellement formé.

A J14 enfin, le trichrome de Masson permet de confirmer dans les deux groupes la reformation d'une corticale qui intervient donc entre J7 et J14. Cependant cette corticale apparaît encore poreuse et nécessite un remodelage. De même, comme observé dans les analyses microscanner, on observe que l'os médullaire a été résorbé en grande partie et ce dans les deux groupes d'animaux. Comme à J7, le bleu Alcian semble indiquer que l'os médullaire et cortical nouvellement formé est de nature plus fibro-cartilagineuse chez l'animal sauvage. Cette coloration montre également une très riche vascularisation traversant toute la zone médullaire lésée (noté \*). Comme pour les autres temps, on retrouve des cellules F4/80<sup>+</sup> dans les deux groupes et à proximité des ostéoblastes (eux-mêmes au contact de l'os néoformé). Le marquage ostérix est également similaire dans les deux groupes, on retrouve des ostéoblastes au contact de l'os nouvellement formé (médullaire et cortical) ainsi que des cellules positives pour ostérix et intégrée au tissu osseux (ostéocytes). Enfin, des ostéoclastes sont nombreux au contact de l'os médullaire et cortical nouvellement formé dans les 2 groupes (Figure 32 et Figure 33).

# Wild-Type

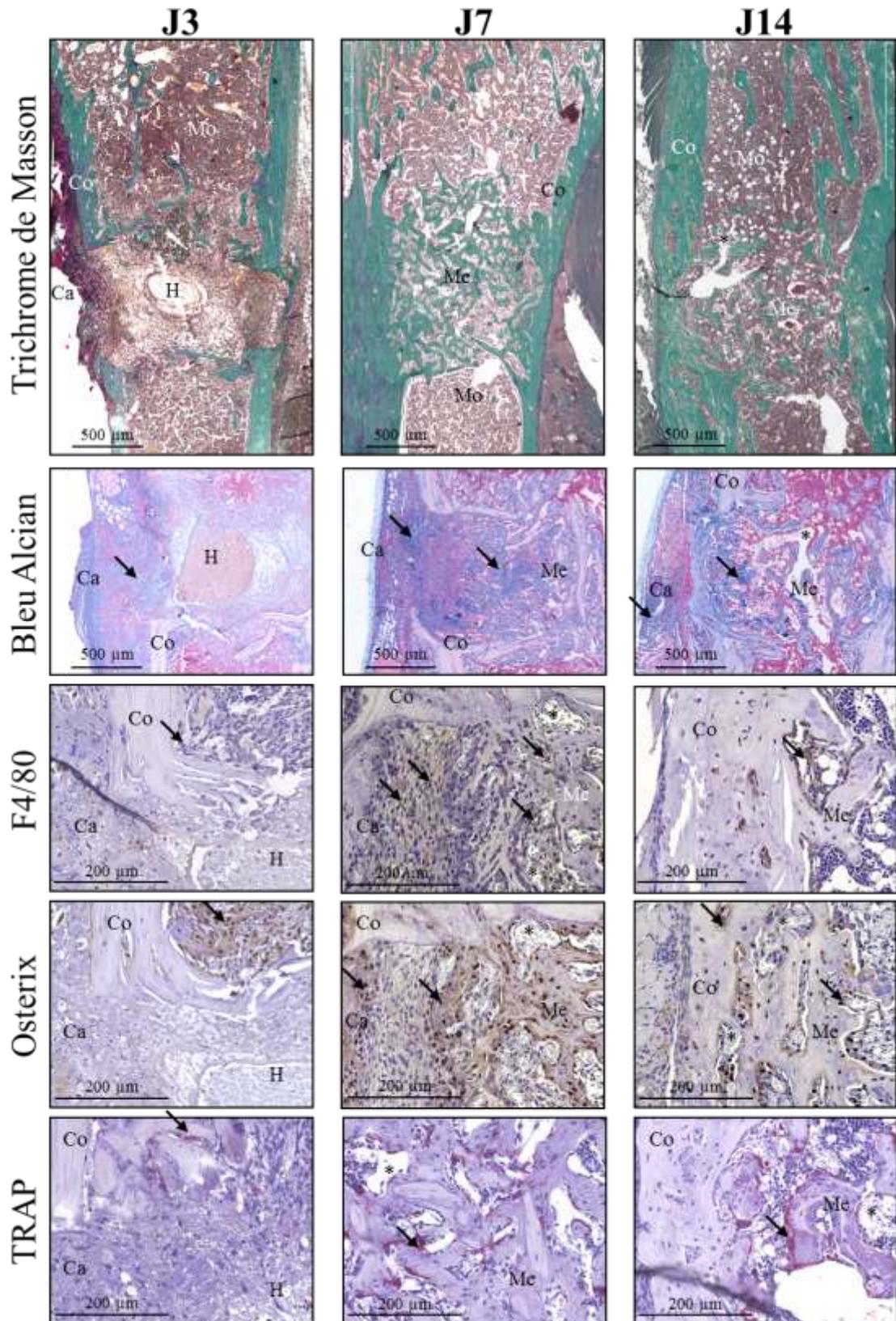


Figure 32 : Analyses histologiques des animaux sauvages à J3, J7 et J14 après la chirurgie. Ca : cal ; Co : cortical ; H : hématome ; Mo : moelle osseuse ; \* : vascularisation ; les flèches noires représentent un marquage spécifique selon la coloration.

# OSM -/-

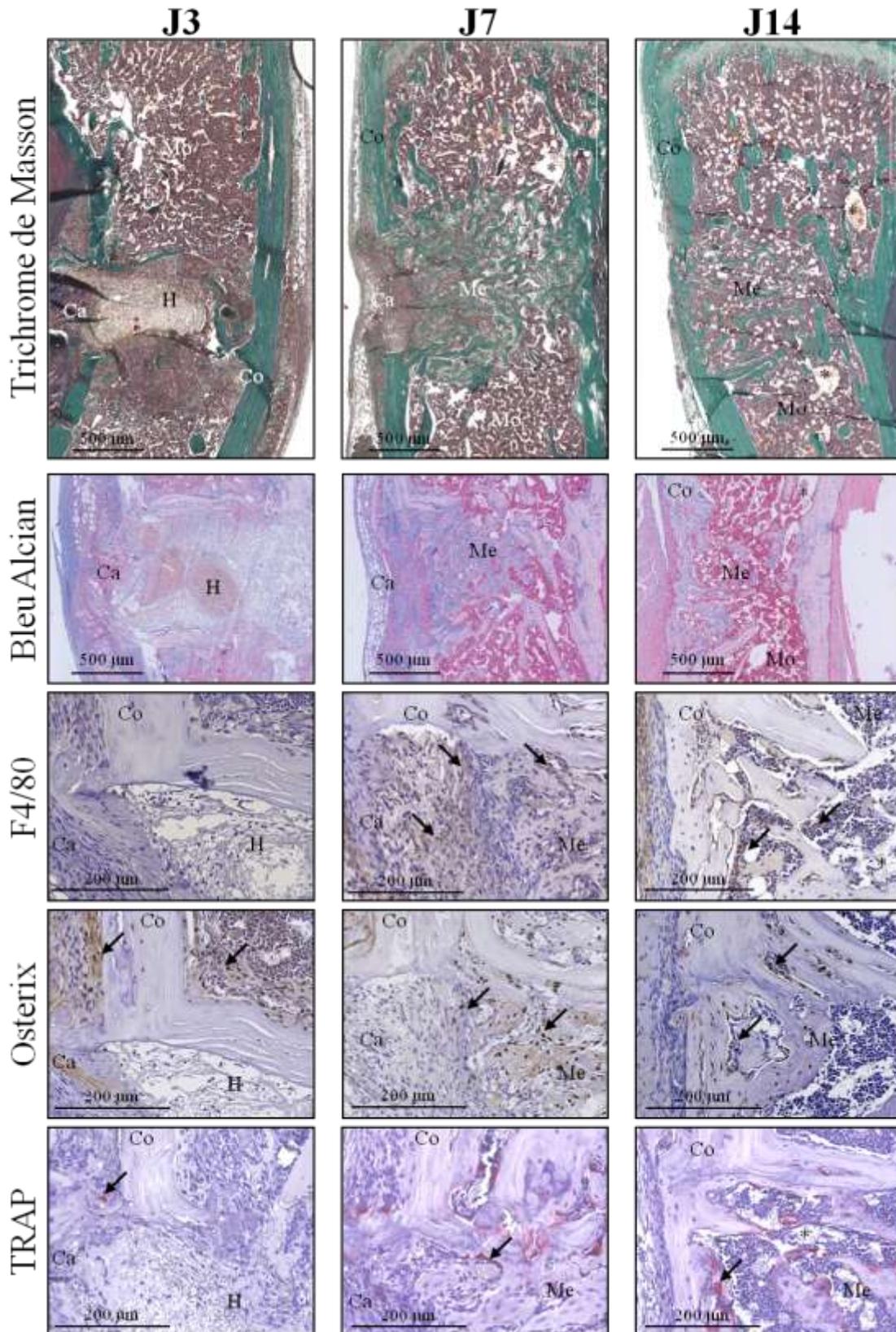


Figure 33 : Analyses histologiques des animaux déficients en OSM à J3, J7 et J14 après la chirurgie. Ca : cal ; Co : cortical ; H : hématome ; Mo : moelle osseuse ; \* : vascularisation ; les flèches noires représentent un marquage spécifique selon la coloration.

## D. Discussion

Si le rôle de l'OSM dans la biologie osseuse a déjà bien été décrit dans la littérature, le phénotype osseux des souris déficientes en OSM n'a, à notre connaissance, jamais été publié. Nous avons observé une tendance non significative pour des os plus ostéopétrotiques chez les souris OSM<sup>-/-</sup>, qui pourrait être reliée à une diminution de l'ostéoclastogenèse comme montré précédemment chez les souris OSMR<sup>-/-</sup> (264). Cependant dans notre cas, l'inactivation de l'OSM altère potentiellement la signalisation de l'OSMR et du LIFR alors que l'inactivation de l'OSMR altère la signalisation de l'OSM et de l'IL-31. De plus, un effet ostéogénique compensatoire ou redondant du LIF ou de l'IL-6 est envisageable (334). Un nombre plus important d'animaux et une étude comparée entre souris OSM<sup>-/-</sup> et OSMR<sup>-/-</sup> sont maintenant nécessaires.

Ensuite, nous avons observé que les transcrits de l'OSM sont exprimés dans les tibias sains en absence de lésion osseuse, cette cytokine serait donc produite par des cellules résidentes (non montré). On peut alors envisager que l'OSM représente un des facteurs de couplage produit par les OsteoMacs et stimulant la formation osseuse au sein des BRC. Une étude a recherché l'expression basale de l'OSM par hybridation *in situ* dans la moelle osseuse mais n'a identifié que les neutrophiles (PNN) et éosinophiles comme producteurs majeurs de cette cytokine (347). Par immunohistochimie, d'autres auteurs ont observé une expression de l'OSM dans les précurseurs myéloïdes et les cellules de l'endoste (264,348). Nous avons également analysé l'expression du gène de l'OSM dans le défaut osseux et dans les tissus lésés environnants (muscle principalement). Il apparaît alors que l'OSM est rapidement surexprimé (dès 8h après chirurgie), ce qui est en accord avec des études montrant que l'OSM est produit par les macrophages activés par la thrombine et suggère donc un rôle de l'OSM dans les phases précoces inflammatoires de la cicatrisation (349). En effet, l'OSM favorise le « rolling » puis l'extravasation des leucocytes ainsi que l'infiltration de polynucléaires éosinophiles au site lésé (291–294), permettant ainsi d'amorcer le recrutement des macrophages inflammatoires producteurs de davantage d'OSM. De plus, il a été montré que des inhibiteurs de la cyclooxygénase ou la délétion de son gène étaient délétères pour la cicatrisation osseuse (349) et nous avons démontré dans la partie I que la production d'OSM par les macrophages est dépendante de la COX2 (334). L'OSM serait donc produit de façon très rapide et transitoire par des cellules activées localement ou recrutées sur le site lésé. Dans ce cadre, la place des macrophages recrutés ou résidents en tant que cellule productrice

d'OSM est possible cependant l'implication des PNN est également envisageable. En effet, ces cellules, attirées par les cellules en apoptose et les nombreux débris résultant du traumatisme, vont migrer vers le site fracturaire durant les premières heures suivant la fracture et produire de très grandes quantités de chémokines et cytokines (155–157).

Dans un second temps, et dans une moindre mesure, on remarque que l'OSM est surexprimée aux temps plus tardifs et se maintient, indiquant donc une possible action supplémentaire. L'OSM pourrait participer à la fois à la mise en place rapide d'un état inflammatoire nécessaire à la cicatrisation mais aussi participer directement à la cicatrisation via son activité anabolique sur le tissu osseux. Ensuite, si l'on observe l'expression des marqueurs ostéoblastiques (cbfa1 et BSP) dans le défaut, on observe une activation successive de ces derniers avec un maximum atteint à J5 pour cbfa1 puis à J7 pour la BSP. Nous pouvons donc imaginer que l'OSM, de par sa production très rapide, participe à l'induction de ces marqueurs ostéoblastiques et donc à la (re)formation osseuse.

Cette possibilité est confirmée par l'analyse microscanner des souris OSM<sup>-/-</sup> après chirurgie. Nous avons choisi un modèle de défaut osseux cortical et médullaire non critique, déjà bien référencé chez le rat (349) et le tibia (350) ou le fémur de souris. A la différence des modèles de fractures, ce modèle constitue une approche simple à mettre en œuvre et très reproductible. De plus, ce type de défaut osseux fait intervenir une ossification principalement de type intramembranaire (349).

Pour les souris sauvage, il apparaît que le comblement du défaut débute entre le 3<sup>ème</sup> et 5<sup>ème</sup> jours après la chirurgie, avec ensuite un pic de formation osseuse médullaire vers J9 puis une formation osseuse corticale autour de J14. Ce modelage ou ossification primaire ne fait pas intervenir d'ossification endochondrale au sens strict du terme car même si un tissu fibro-cartilagineux est visible, aucun chondrocyte n'a pu être mis en évidence. Il s'agit donc plutôt d'une ossification intramembranaire à partir d'une matrice fibreuse riche en glycosaminoglycanes. En parallèle, des (pré)ostéoblastes osterix<sup>+</sup> sont identifiés avant même la formation de cet ostéoïde, au niveau de l'endoste et de la future corticale. De nombreux vaisseaux sont également visibles dès J7. Les ostéoclastes sont quant à eux visibles tout d'abord au niveau des débris osseux provoqués par la chirurgie puis au contact de l'ostéoïde, suggérant que le remodelage commence très rapidement après la phase d'ossification primaire. A J14, l'ostéoïde médullaire est d'ailleurs en grande partie résorbé, laissant la place à la moelle osseuse.

Pour les animaux OSM<sup>-/-</sup>, l'analyse microscanner montre un retard significatif d'ossification primaire. Ce retard est transitoire, de l'ordre de 1,5 jour, la formation de la

corticale et le remodelage par les ostéoclastes se déroulant selon une cinétique comparable au animaux sauvages. L'ostéoïde et la cal dans son ensemble apparaissent moins riches en glycosaminoglycanes, le nombre des ostéoblastes semble également réduit alors que les ostéoclastes sont en nombre identique dans les 2 groupes. Il faut noter encore une fois que cette analyse histologique doit maintenant être confirmée sur un nombre plus important d'animaux.

Le suivi des macrophages au cours de la cicatrisation osseuse suggère un rôle important pour la formation de l'ostéoïde. Dans les 2 groupes d'animaux, le nombre des cellules F4/80<sup>+</sup> est fortement augmenté entre J3 et J7, ces cellules étant retrouvées à proximité voir au contact des (pré)ostéoblastes au niveau de la future corticale et de l'ostéoïde médullaire. On peut donc penser que les macrophages, bien qu'ils semblent être présents dans les deux groupes en nombre comparable, ne produisent pas d'OSM dans le groupe KO induisant ainsi un retard d'ossification. L'implication des macrophages dans les processus d'ossification a, d'ailleurs, déjà été montrée, les OsteoMacs, présents dans l'os sain au contact du périoste et de l'endoste, à proximité des cellules bordantes, semblent avoir un rôle majeur dans l'ossification intramembranaire durant la cicatrisation (142). A l'inverse, les macrophages inflammatoires recrutés au niveau du site lésé sont plus impliqués dans les phénomènes d'ossification enchondrale (156). En effet, des souris déficientes pour le CCR2 (un marqueur des macrophages inflammatoires) ont un retard dans les processus précoces d'ossification enchondrale alors que l'ossification intramembranaire (plus tardive) n'est pas affectée.

Lors de cette étude nous avons utilisé le microscanner afin d'évaluer la cinétique de réparation chez la souris, or cette technique, bien qu'elle soit non-invasive implique que les animaux soient anesthésiés et irradiés par des rayons X fréquemment, ce qui peut constituer un biais dans notre étude. Un autre problème majeur rencontré lors de cette étude est que nous n'avons pas été en mesure d'identifier les cellules productrices d'OSM ainsi que les cibles de cette cytokine. C'est pourquoi il est crucial de mettre au point des techniques de détection de l'OSM, et dans ce cadre la mise au point de l'immunohistochimie pour l'OSM murin est en cours au sein du laboratoire. Cependant, l'OSM étant une cytokine diffusible, un marquage par immunohistochimie n'identifiera pas nécessairement la cellule productrice. C'est pourquoi nous mettons également au point la technique d'hybridation *in situ* afin d'identifier les cellules dans lesquels le gène de l'OSM est transcrit. Dans un deuxième temps et afin de détecter les cibles de l'OSM dans le défaut osseux, nous avons également commencé à valider l'immunohistochimie spécifique de la forme phosphorylée de STAT3 qui est le facteur de transcription majeur activé par l'OSM.

Si nous parvenons à identifier le macrophage comme étant la principale cellule productrice d'OSM, nous devons ensuite déterminer si cette production d'OSM est réalisée par des macrophages résidents comme les OsteoMacs et/ou par des macrophages inflammatoires recrutés. Dans cette étude nous avons utilisé un immunomarquage F4/80, cependant celui-ci permet d'identifier tous les macrophages sans faire de distinctions. Il serait donc intéressant de réaliser un immunomarquage spécifique de l'une ou l'autre des populations comme CCR2 ou MAC-2 spécifiques des macrophages recrutés (142,156). Enfin, dans le but de compléter l'étude d'Alexander et al, nous devons démontrer le rôle des OsteoMacs en tant que cellules productrices d'OSM, pour cela des techniques de détection de l'OSM (RT-PCR, hybridation *in situ* ou immunohistochimie) devront être associées à une déplétion macrophagique soit grâce un modèle murin transgénique : MAFIA soit par injection de « clodronate liposome » (142). De même, il est nécessaire d'évaluer une possible production d'OSM très précoce par des PNN envahissant le site lésé dans les premières heures suivant la chirurgie, pour cela l'utilisation d'un marqueur des PNN comme le Ly6G permettrait de détecter ces cellules par immunohistochimie ou même de réaliser une déplétion en PNN chez la souris (351). Enfin, s'il est évident que l'OSM exerce un rôle ostéogénique en stimulant la différenciation ostéoblastique et la minéralisation de la MEC, d'autres aspects devront être envisagés. Tout d'abord, nos études au laboratoire ont montré que l'OSM était capable de stimuler la prolifération des MSC *in vitro* (non montré). Or, une augmentation locale du pool de MSC disponible peut être au moins en partie responsable d'une formation osseuse accrue. Ensuite, il a été montré que l'OSM pouvait stimuler la migration de cellules cancéreuses dérivant d'ostéoblastes (46), il est donc envisageable qu'un effet similaire soit constaté sur des ostéoblastes normaux ce qui encore une fois permettrait d'augmenter le pool de cellules ostéoblastiques disponible et donc favoriserait la formation osseuse. Enfin, l'OSM pourrait induire l'angiogenèse, de façon directe sur les cellules endothéliales ou indirecte, via une stimulation de la production de VEGF, ce qui induirait encore une fois une stimulation de la formation osseuse (352). Ces hypothèses et perspectives de travail sont présentées Figure 34.

Ces résultats, s'ils sont confirmés par de nouvelles analyses, soulignent le rôle majeur de l'OSM en tant que molécule anabolique et permettant de stimuler la cicatrisation osseuse lors des phases précoces inflammatoires et celles plus tardives de formation osseuse. Cette molécule produite par les macrophages résidents et/ou infiltrant la zone lésée participerait à la formation du cal fibrocartilagineux nécessaire à la l'ossification intramembranaire et ce sans être impliqué dans les processus de remodelage osseux plus tardifs et qui dépendent des

ostéoclastes. L'OSM n'est pas seul impliqué dans ces processus, l'IL-6 ayant un mode d'action sans doute très proche. Des études sur des souris double KO pour l'OSM et l'IL-6 seraient intéressantes à mener, de même que des études associant l'OSM, l'IL-6, les BMP, et/ou la PTH comme molécules anaboliques pour la consolidation de défauts osseux critiques. A terme, ces études permettraient d'améliorer la compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans la cicatrisation osseuse et pourraient permettre le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques pour le traitement des patients souffrants de traumatismes osseux ne pouvant se consolider sans aide pharmacologique ou chirurgicale.

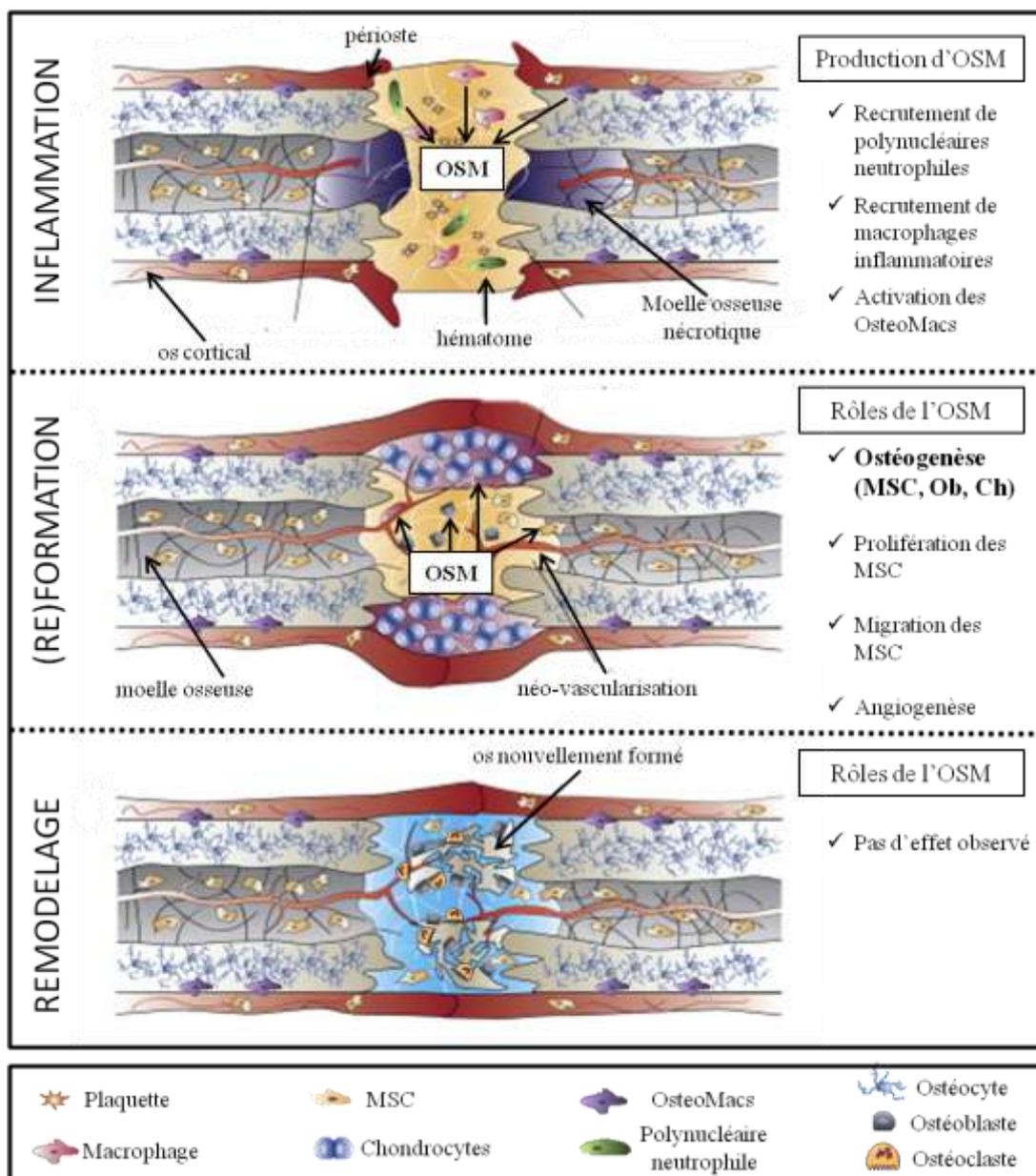


Figure 34 : Schéma récapitulatif des rôles de l'OSM et de ses modes de production : hypothèses et perspectives de travail, adapté de (152).

CONCLUSIONS  
GENERALES  
&  
PRESPECTIVES

Le tissu osseux est un tissu conjonctif complexe en perpétuel remaniement, reposant sur l'équilibre de deux mécanismes: la formation et la résorption osseuse. Ces derniers pourront être régulés par de nombreuses hormones, cytokines et facteurs de croissance capables de contrôler les deux types cellulaires responsables de l'homéostasie osseuse : les ostéoblastes et les ostéoclastes. S'il est déjà bien établi que ces deux populations cellulaires peuvent se réguler l'une, l'autre afin de maintenir un remodelage harmonieux, il est connu depuis peu que le système immunitaire, sous certaines conditions, peut contrôler l'homéostasie osseuse. Cette récente observation a permis l'émergence d'un nouveau domaine de recherche, l'ostéoinmunologie. Par exemple, parmi les cellules immunitaires, les macrophages, en plus d'intervenir dans le contrôle du système immunitaire, semblent jouer un rôle majeur dans la physiopathologie du tissu osseux. En effet, la capacité de la lignée monocyte / macrophage à produire de très grandes quantités de médiateurs solubles (dont beaucoup sont connus pour être actif sur le remodelage) ainsi que sa proximité avec l'ostéoclaste, qui partage un progéniteur commun font du macrophage un bon candidat dans l'étude de la relation entre système immunitaire et tissu osseux. Une dérégulation locale du système immunitaire pourra d'ailleurs entraîner l'apparition de pathologies osseuses ostéolytiques telles que la PR (97). De même, bien que l'os soit l'un des rares tissus présentant une aptitude à se réparer et bien que les traitements aient considérablement évolué ces dernières dizaines d'années, une grande partie des traumatismes musculo-squelettiques ne restent encore de nos jours que partiellement consolidés. Il est donc crucial de mieux comprendre le rôle de tous les acteurs intervenant dans l'homéostasie osseuse. Aussi le but de cette thèse était d'identifier un ou plusieurs facteurs de couplage produits par la lignée monocytes / macrophages et exerçant une activité anabolique sur les ostéoblastes ; de comprendre les modes de production de ces facteurs ; de comprendre les mécanismes moléculaires induisant la production d'une MEC minéralisée par les ostéoblastes. Puis dans un second temps, notre but a été de confirmer ces observations *in vivo* grâce à un modèle murin de cicatrisation osseuse via la création d'un défaut cortical et médullaire non critique.

Cette thèse a permis de mettre en évidence le rôle majeur des cytokines de la famille de l'IL-6, et plus particulièrement de l'OSM, en tant que facteur de couplage anabolique produit par les monocytes / macrophages et agissant sur les ostéoblastes. Cette cytokine, comme la plupart des cytokines, n'exerce pas ces effets de façon restreinte à un tissu, elle est également très active en tant que molécule pro-inflammatoire et stimulatrice du remodelage de la MEC ou de l'hématopoïèse. Produite par les lymphocytes T activés, macrophages activés, cellules dendritiques et neutrophiles (288,289), nous avons précisé dans cette étude qu'elle est

produite par les macrophages M1 activés par un ligand des TLRs, le LPS, et selon une voie COX2 / PGE<sub>2</sub> dépendante. L'OSM peut alors se fixer à son récepteur de type II (gp130/OSMR) à la surface des MSC entraînant l'activation du facteur de transcription STAT3, la différenciation ostéoblastique puis la minéralisation de la MEC.

Les macrophages sont donc, sous certaines conditions inflammatoires, responsables de la production de médiateurs solubles possédant des propriétés ostéoinductrices comme l'OSM. Aussi, il serait intéressant de caractériser de façon précise les sous populations macrophagiques productrices d'OSM dans différentes pathologies inflammatoires osseuses telles que la PR ou la SPA. Il a d'ailleurs déjà été montré que la production d'OSM, suite à l'injection d'un adénovirus codant l'OSM murine au niveau du genou de souris induit une inflammation localisée avec destruction du cartilage et de l'os sous-chondral (ceci représentant un modèle de PR) mais cela est également associé à une formation osseuse périostée (296). Aucune donnée n'étant actuellement disponible sur l'OSM dans la SPA, il est donc justifié d'évaluer le rôle potentiel de cette cytokine en tant que molécule anabolique responsable, au moins en partie, des formations osseuses ectopiques observées dans la SPA.

C'est pourquoi, nous avons, en collaboration avec le service de rhumatologie du CHU de Nantes, collecté des liquides synoviaux de 25 patients atteints de PR, 19 atteints de SPA et 17 atteints d'ostéoarthrite (OA) et représentant les contrôles non-inflammatoires. Ces liquides synoviaux ont été dosés pour 34 chémokines et cytokines pro- ou anti-inflammatoires (IL-1, IL-6, TNF $\alpha$ , IL-10, IL-1RA, OSM,...) par technologie Luminex (Bioplex, Biorad) ou ELISA.

Pour cette étude préliminaire, nous avons observé que l'OSM est présente en quantité significativement supérieure au contrôle non-inflammatoire (ostéoarthrite) dans le groupe PR et dans une moindre mesure dans le groupe SPA. De plus, il existe une corrélation positive entre la concentration de cette cytokine et le nombre d'éléments cellulaires et donc l'état inflammatoire du patient ( $r^2 = 0.351$ ). Les médiateurs M1 (IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-12, IFN $\gamma$  etc) sont eux aussi moins exprimés dans la SPA que dans la PR, mais c'est également le cas pour les médiateurs M2 (IL-1RA, IL-10, IL-4 etc). On note cependant des concentrations d'IL-17, IL-6, LIF, SDF1 $\alpha$  et VEGF supérieures dans la SPA que dans la PR (Figure 35). Nous n'avons pas encore dosé l'IL-22 ou l'IL-23 dont l'implication a déjà été montrée dans la SPA (344).

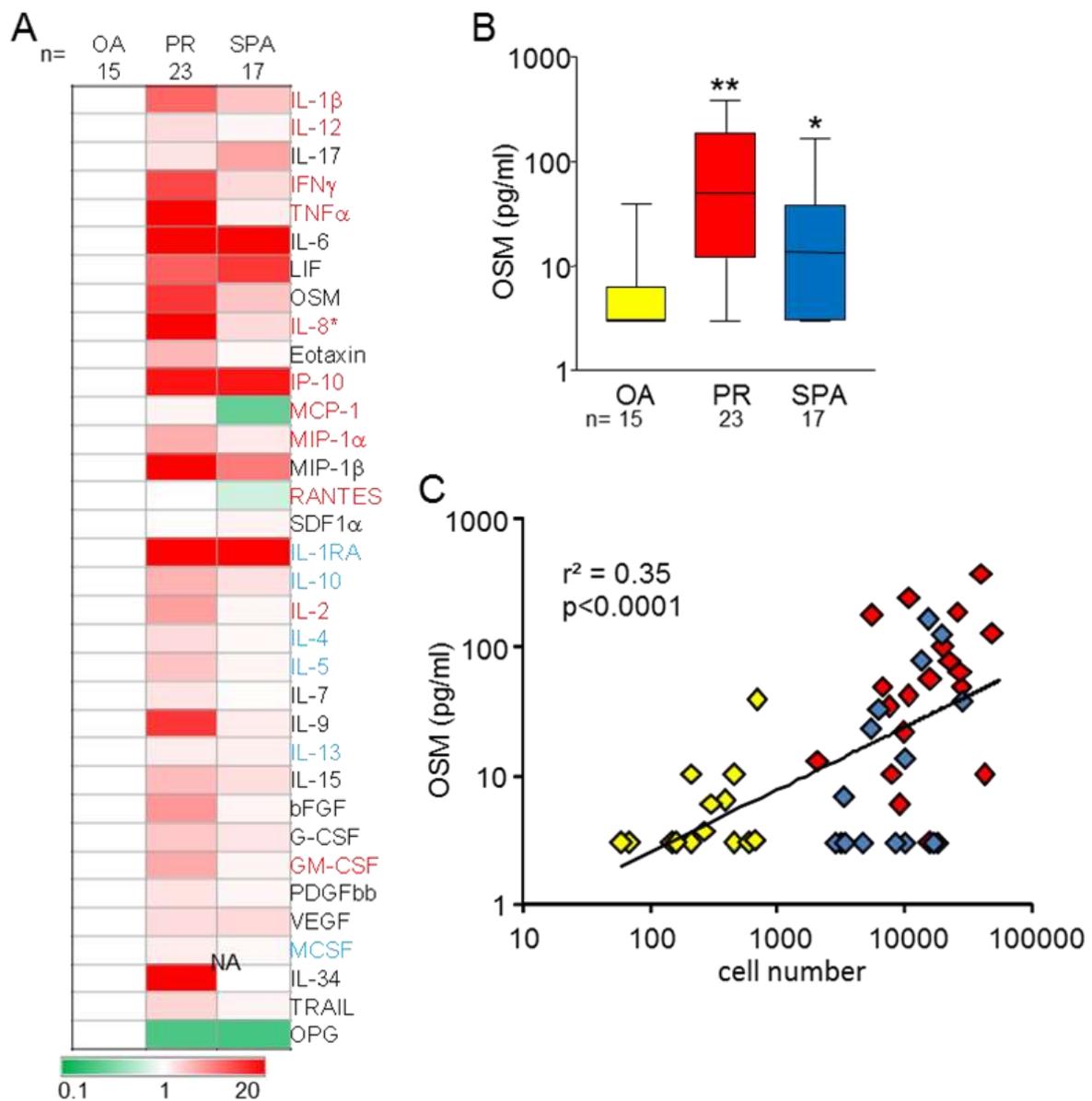


Figure 35 : Dosage de médiateurs solubles dans le liquide synovial de patients atteints d'OA, de PR ou de SPA. (A) L'expression relative des médiateurs par rapport à l'OA (fixé à 1) est représentée selon le code couleur indiqué. Les médiateurs M1 sont indiqués en rouge, les médiateurs M2 en bleu. (B) Expression de l'OSM, représentation box plot, \*\* =  $p < 0.0005$  ; \* =  $p < 0.05$  par rapport à l'OA. (C) Corrélation positive entre la concentration en OSM et le nombre d'éléments cellulaires dans le liquide synovial.

Ces résultats confirment donc que la PR présente un profil plus M1 que la SPA mais ne confirment pas un profil M2 dans la SPA. Ces résultats suggèrent plutôt un rôle clé de l'IL-17, des cytokines de la famille de l'IL-6 et du VEGF dans la SPA, ces cytokines ayant des capacités ostéogéniques et ostéoinductrices certaines. Dans ce contexte, l'OSM, l'IL-6 et le LIF pourraient être impliqués dans les formations osseuses au niveau des enthèses, mais cette hypothèse devra être testée dans des modèles animaux adéquats. Bien sûr, ces cytokines peuvent également être impliquées dans les ostéolyses, notamment dans la PR, et il est

important maintenant de mieux comprendre les mécanismes ou conditions physiopathologiques qui pourraient expliquer que ces cytokines sont parfois ostéogéniques et parfois ostéolytiques.

De plus, il est envisageable que les ostéoclastes présents sur les sites de destructions articulaires dans la PR soient différents de ceux impliqués dans le remodelage osseux physiologique ou au cours de l'ostéoporose. Aussi, la caractérisation phénotypique de ces « ostéoclastes inflammatoires » permettrait d'espérer un ciblage plus spécifique de ces cellules en conditions pathologiques. Enfin, le développement de traitements plus ciblés pour l'ostéoporose (anticorps anti-cathepsine K, inhibiteur de pompes à protons) pourrait également bénéficier aux patients porteurs de PR. De nouveaux projets se développent actuellement au sein du laboratoire, en effet, nous nous intéressons au phénotype et à la capacité de différenciation des ostéoclastes issus de monocytes périphériques de patients porteurs de rhumatismes inflammatoires. Si le sous-type de monocytes périphériques CD14<sup>LOW</sup> CD16<sup>HIGH</sup> semble être impliqué dans l'ostéoclastogénèse pour les rhumatismes psoriasiques (353), aucune donnée n'est à notre connaissance disponible concernant l'étude du même phénomène au cours de la PR ou de la SPA. C'est pourquoi la purification, les caractéristiques phénotypiques ainsi que la capacité de différenciation de ces monocytes présents dans la synoviale inflammatoire sont un projet d'étude que nous développons actuellement.

Les résultats de cette première partie nous permettent donc d'envisager que lors d'atteinte osseuse inflammatoire, infectieuse ou mécanique, les cytokines de la famille gp130 comme l'OSM, produites en partie par la lignée monocytes / macrophages, sont capables de stimuler la (re)formation osseuse et permettent donc, au moins en partie, la résolution de l'atteinte osseuse. Ces dernières semblent donc être de bonnes cibles pour de nouvelles stratégies thérapeutiques anaboliques. Cependant, bien que cette première étude nous ait permis de démontrer le rôle anabolique de l'OSM *in vivo* (par surexpression via un vecteur adénoviral), il était nécessaire d'étudier la production d'OSM endogène et son rôle dans différents contextes physiopathologiques.

C'est pourquoi dans un second temps, nos objectifs étaient d'évaluer l'expression de l'OSM lors des différentes phases de la cicatrisation osseuse puis d'étudier le rôle de l'OSM dans la cicatrisation d'un défaut osseux non-critique chez la souris via une approche comparative entre souris sauvages et souris déficientes en OSM.

Tout d'abord, nos résultats, bien que préliminaires, ont permis de montrer que la délétion de l'OSM chez la souris n'induit pas l'apparition d'un phénotype osseux particulier.

Au vu de nos résultats précédents, nous pouvions nous attendre à un profil plus ostéoporotique pour ces souris OSM  $-/-$ , cependant, nous avons observé une tendance non significative pour des os plus ostéopétrotiques, comme observé pour les souris OSMR $-/-$ . En effet, cette cytokine bien qu'ayant une activité anabolique exerce également des activités cataboliques via l'augmentation de l'expression de RANKL par les ostéoblastes (264). De plus, il est également probable que l'absence d'OSM soit compensée par la redondance d'activités des cytokines de la famille de l'IL-6 comme le LIF.

Nos analyses par RT-PCR ont ensuite permis de confirmer l'expression d'OSM dans l'os physiologique, nous pouvons alors envisager que cette cytokine soit produite par les macrophages résidents en site osseux (les OsteoMacs). L'OSM pourrait alors représenter un facteur de couplage majeur produit par les OsteoMacs de la canopée et intervenant au sein des BRC. Cela a été récemment supporté par les travaux de Nicolaidou et al, qui ont permis de montrer que l'OSM pouvait être produit en condition physiologique par la lignée monocytes / macrophages et ainsi agir sur les précurseurs ostéoblastiques pour stimuler l'ostéogénèse (342). Cette hypothèse, si elle est confirmée, placerait l'OSM comme une cytokine permettant d'initier les phases d'apposition osseuse lors du remodelage osseux physiologique. Cela doit donc être vérifié *in vivo* par des analyses immunohistochimiques et/ou par hybridation *in situ*.

Par ailleurs, notre étude a permis de démontrer le rôle de l'OSM dans la réparation d'un défaut osseux non-critique chez la souris. Cependant, nous avons été confrontés à des problèmes techniques, en effet, il nous a été impossible de mettre en évidence la présence d'OSM au sein du défaut osseux par technique d'immunohistochimie. Ceci constitue donc une limite dans cette étude, il est donc crucial de développer dans le laboratoire des méthodes de détections de l'OSM *in vivo*. C'est pourquoi nous développons actuellement la technique d'hybridation *in situ* qui permettrait de mettre en évidence de façon spécifique les cellules dans lesquelles le gène codant l'OSM est surexprimé. Dans un second temps, il est également nécessaire de définir avec certitude quelles sont les cibles de l'OSM au sein du défaut osseux, aussi nous développons également l'immunohistochimie spécifique de la forme phosphorylée de STAT3.

Cette thèse a permis de placer l'OSM comme étant une cytokine produite lors des phases précoces de l'inflammation osseuse et participant à la réparation tissulaire. Ce rôle dans la réparation tissulaire n'est d'ailleurs pas restreint au tissu osseux. En effet, il a été montré que l'OSM produit par des macrophages activés de façon chronique pouvait participer, via le PGE2, à la réparation de lésions cutanées (354). De même, lors de lésions

cutanées aiguës, les PNN, premières cellules envahissant le site lésé, participent à la cicatrisation via une production d'OSM (355).

Cependant le rôle précis de l'OSM sur l'inflammation reste à ce jour controversé, certaines études décrivent l'OSM comme étant une cytokine à dominante pro-inflammatoire quand d'autres la décrivent comme une cytokine anti-inflammatoire. Par exemple, sur les cellules endothéliales (cellules qui possèdent de nombreux récepteurs à l'OSM à leur surface), l'OSM induit la production d'IL-6 (292) ainsi que d'une grande quantité de P-sélectine connue pour favoriser l'adhésion et le « rolling » de leucocytes nécessaire à leur extravasation (291). A l'inverse, l'OSM peut réguler négativement le processus inflammatoire, par exemple en inhibant l'expression de l'IL-8 et du granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) induite par l'IL-1 dans des cultures de fibroblastes (298). Cette cytokine apparaît donc exercer à la fois un rôle pro-inflammatoire et un rôle anti-inflammatoire selon le contexte tissulaire.

De même, il est crucial de prendre en considération la toxicité élevée de cette molécule lorsqu'elle est délivrée de façon systémique et à haute dose, grâce à un vecteur adénoviral injecté dans le muscle par exemple (356). Une meilleure gestion des effets indésirables de l'OSM passant par une meilleure connaissance de sa toxicité, différentes hypothèses peuvent être suggérées. Dans le foie tout d'abord, il a été montré que l'IL-33 en agissant sur les lymphocytes infiltrant le foie induit une fibrose hépatique sévère (357) or il a également été montré que l'IL-33 est produite par les ostéoblastes après activation par l'OSM (358). D'autres auteurs suggèrent que l'OSM serait responsable de la mise en place de fibres pulmonaires et participerait au développement de réponses allergiques (359). Enfin, dans les reins, il a été montré que l'OSM favorise la trans-différentiation des cellules épithéliales tubulaires en cellules myofibroblastiques ceci conduisant à une fibrose rénale (360).

Afin de pallier à cette toxicité de l'OSM, différentes solutions sont envisageables soit au niveau du mode d'administration soit par une distribution plus locale. Cela est par exemple envisageable via le ciblage spécifique de l'os, pour cela différentes méthodes peuvent être envisagées. Par exemple, des nanoparticules couplées à des anticorps spécifiques permettent d'apporter une molécule thérapeutique à une cellule donnée (361). On peut noter également qu'une thérapie génique utilisant un promoteur spécifique du tissu osseux comme le gène *coll1a1* est théoriquement envisageable.

Une bonne option pour l'utilisation des propriétés de l'OSM serait l'utilisation de l'ingénierie tissulaire osseuse. En effet, lors du remodelage osseux, lorsque les ostéoblastes produisent la matrice osseuse, de très nombreux facteurs de croissance sont piégés dans cette

matrice minéralisée. La matrice osseuse joue alors un rôle de réservoir en cytokines et autres facteurs de croissance (362) et, ces derniers seront libérés par les ostéoclastes au moment de la résorption osseuse. Lors de traumatismes osseux, comme les fractures, cette libération de cytokines et facteurs de croissance par les ostéoclastes sera également appuyée par celle permise par les plaquettes et les cellules inflammatoires envahissant le site lésé. C'est pourquoi les cliniciens utilisent des greffes d'os déminéralisé en tant que support ostéoinductif et ostéoconductif et permettant de faciliter la cicatrisation de perte de substance telle que la réparation ne peut se réaliser sans intervention chirurgicale. Cette matrice osseuse déminéralisée est composée majoritairement de collagène de type I associé à des protéines osseuses comme l'OC, la BSP, l'OPN ou des BMPs et, l'absence de matrice minérale facilite grandement la biodisponibilité de ces protéines osseuses permettant ainsi une meilleure ostéoconduction, -induction et -géné. Or il a été montré que l'OSM était capable de se lier à des fibres de collagène de type I, le constituant majoritaire de l'os, immobilisées sur une membrane de nitrocellulose (363), nous pouvons donc penser que l'OSM, au même titre que les autres protéines osseuses, puissent être séquestrée au sein de la matrice osseuse. De plus, une étude a permis de démontrer le rôle de l'OSM en tant que molécule ostéoinductive dans un modèle de défaut osseux critique comblé par une matrice osseuse déminéralisée mais préalablement déplétée en protéines osseuses (337). Ce type de matrice osseuse déminéralisée et déplétée en protéines osseuses mais enrichie en OSM (nous pouvons également imaginer utiliser un facteur de survie pour la lignée monocyte / macrophage) permet donc de stimuler davantage l'ostéoinduction et l'ostéogéné. Ainsi l'ostéoinduction par des facteurs de croissance ou des molécules exogènes semble envisageable en chirurgie orthopédique ou maxillo-faciale. A terme, ces molécules ostéoinductives, associées à une matrice osseuse déminéralisée pourraient permettre la restauration de défaut osseux dont la consolidation est impossible à ce jour.

En outre, les chirurgiens utilisent également des greffes osseuses autologues afin de réaliser le comblement de défaut osseux de taille critique. Cependant, ils sont limités quant à la taille de ce greffon, on peut alors imaginer que si l'on est en mesure d'augmenter l'efficacité de ces greffes par des molécules exogènes cela pourrait permettre de limiter cette taille et donc de diminuer la morbidité liée au prélèvement. Nous pouvons d'ailleurs imaginer des thérapies doubles visant à la fois à stimuler l'ostéoinduction grâce aux BMPs ou à l'OSM par exemple, associé à une molécule pro-angiogénique et représentant un facteur ostéoconducteur permettant ainsi de limiter au maximum la taille du greffon autologue voire, même, de s'en affranchir. Ces perspectives thérapeutiques s'appliquent aux pathologies

traumatiques locales mais nous pouvons également imaginer des thérapies visant à limiter les pertes osseuses observées dans certaines pathologies systémiques comme la PR ou l'ostéoporose.

Cependant, malgré les progrès de la médecine, l'utilisation des greffes autologues se trouve confrontée à de nombreuses limites. Une des principales limites est l'intervention chirurgicale au niveau d'un second site opératoire qui dans environ 20% des cas entraîne des complications liées à la chirurgie elle-même ou à un risque infectieux (364). De plus, la quantité d'os prélevable est bien entendu limitée et, dans le cas de pertes importantes, l'autogreffe peut s'avérer insuffisante. Aussi, et dans le but de s'affranchir totalement de ces greffes osseuses autologues et donc de la morbidité liée au prélèvement, des biomatériaux inertes et permettant de mimer le microenvironnement osseux ont été développés. Actuellement, les biomatériaux les plus étudiés sont les céramiques synthétiques composées de calcium et de phosphates, les matériaux à base d'hydroxyapatite, de phosphate tricalcique ou les phosphates de calcium biphasés. Ces substituts osseux synthétiques constituent des outils indispensables à l'ingénierie tissulaire osseuse, en effet, associés avec des cellules ostéoprogénitrices, comme les MSC, ils exercent un rôle de support aux ostéoprogéniteurs et ont l'avantage d'être disponibles en grande quantité pour un faible coût de production et de ne pas provoquer de réactions immunogènes une fois implantés. Dans le cadre de traitement des défauts osseux de taille critique, la méthode qui semble la plus prometteuse nécessite la purification et l'amplification des MSC du donneur *in vitro* puis une 2<sup>ème</sup> étape *in vitro* de culture de ces MSC sur le biomatériau avant l'implantation au niveau du défaut osseux (365). Cette méthode a, en outre, l'avantage de permettre l'ajout de molécules ostéogéniques comme des BMPs ou de l'OSM durant les périodes de culture *in vitro*. A la vue de nos résultats, nous pouvons alors imaginer de nouveaux protocoles associant les propriétés ostéoconductive du substitut osseux synthétique, les propriétés ostéoinductives des monocytes / macrophages via l'OSM et le potentiel ostéogénique des MSC. Ces stratégies innovantes sont d'ailleurs en cours d'étude au sein du laboratoire.

Bien entendu, une seule molécule ne pourra permettre une reconstruction osseuse complète, c'est pourquoi le futur des thérapies visant à contrer les pertes osseuses, traumatiques ou non, passera nécessairement par des associations de molécules ostéoactives et, ceci dans le but de mimer au mieux le micro-environnement osseux.

# BIBLIOGRAPHIE

1. Toppets V, Pastoret V, De Behr V, Antoine N, Dessy C, Gabriel A. Morphologie, croissance et remaniement du tissu osseux. *Ann. Md. vét.* 2004;148:1-13.
2. Swaminathan R. Biochemical markers of bone turnover. *Clin. Chim. Acta.* 2001 nov;313(1-2):95-105.
3. Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet.* 1970 oct;3(4):393-403.
4. Owen M. Marrow stromal stem cells. *J. Cell Sci. Suppl.* 1988;10:63-76.
5. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2006 janv;8(4):315-7.
6. Pontikoglou C, Delorme B, Charbord P. Human bone marrow native mesenchymal stem cells. *Regen Med.* 2008 sept;3(5):731-41.
7. Jackson L, Jones DR, Scotting P, Sottile V. Adult mesenchymal stem cells: differentiation potential and therapeutic applications. *J Postgrad Med.* 2007 juin;53(2):121-7.
8. Djouad F, Plence P, Bony C, Tropel P, Apparailly F, Sany J, et al. Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals. *Blood.* 2003 nov 15;102(10):3837-44.
9. Ehninger A, Trumpp A. The Bone Marrow Stem Cell Niche Grows up: Mesenchymal Stem Cells and Macrophages Move In. *J Exp Med.* 2011 mars 14;208(3):421-8.
10. Friedenstein AJ, Latzinik NW, Grosheva AG, Gorskaya UF. Marrow microenvironment transfer by heterotopic transplantation of freshly isolated and cultured cells in porous sponges. *Exp. Hematol.* 1982 févr;10(2):217-27.
11. Calvi LM, Adams GB, Weibrecht KW, Weber JM, Olson DP, Knight MC, et al. Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature.* 2003 oct 23;425(6960):841-6.
12. Wilson A, Trumpp A. Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. *Nature Reviews Immunology.* 2006 févr 1;6(2):93-106.
13. Méndez-Ferrer S, Michurina TV, Ferraro F, Mazloom AR, MacArthur BD, Lira SA, et al. Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature.* 2010 août 12;466(7308):829-34.
14. Komori T, Yagi H, Nomura S, Yamaguchi A, Sasaki K, Deguchi K, et al. Targeted disruption of *Cbfa1* results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell.* 1997 mai 30;89(5):755-64.
15. Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, Zhang Z, Deng JM, Behringer RR, et al. The Novel Zinc Finger-Containing Transcription Factor Osterix Is Required for Osteoblast Differentiation and Bone Formation. *Cell.* 2002 janv 11;108(1):17-29.

16. Celil AB, Hollinger JO, Campbell PG. Osx transcriptional regulation is mediated by additional pathways to BMP2/Smad signaling. *J. Cell. Biochem.* 2005 juin 1;95(3):518-28.
17. Koga T, Matsui Y, Asagiri M, Kodama T, Crombrughe B de, Nakashima K, et al. NFAT and Osterix cooperatively regulate bone formation. *Nature Medicine.* 2005 juill 24;11(8):880-5.
18. Wagner EF. Functions of AP1 (Fos/Jun) in bone development. *Ann Rheum Dis.* 2002 janv 11;61(suppl 2):ii40-ii42.
19. Acampora D, Merlo GR, Paleari L, Zerega B, Postiglione MP, Mantero S, et al. Craniofacial, vestibular and bone defects in mice lacking the Distal-less-related gene *Dlx5*. *Development.* 1999 sept;126(17):3795-809.
20. Liu YH, Tang Z, Kundu RK, Wu L, Luo W, Zhu D, et al. *Msx2* gene dosage influences the number of proliferative osteogenic cells in growth centers of the developing murine skull: a possible mechanism for *MSX2*-mediated craniosynostosis in humans. *Dev. Biol.* 1999 janv 15;205(2):260-74.
21. Gutierrez S, Javed A, Tennant DK, van Rees M, Montecino M, Stein GS, et al. CCAAT/enhancer-binding proteins (C/EBP) beta and delta activate osteocalcin gene transcription and synergize with *Runx2* at the C/EBP element to regulate bone-specific expression. *J. Biol. Chem.* 2002 janv 11;277(2):1316-23.
22. Harrison JR, Huang Y-F, Wilson KA, Kelly PL, Adams DJ, Gronowicz GA, et al. *Coll1a1* promoter-targeted expression of p20 CCAAT enhancer-binding protein beta (C/EBPbeta), a truncated C/EBPbeta isoform, causes osteopenia in transgenic mice. *J. Biol. Chem.* 2005 mars 4;280(9):8117-24.
23. Marie PJ. Transcription factors controlling osteoblastogenesis. *Arch. Biochem. Biophys.* 2008 mai 15;473(2):98-105.
24. Gaur T, Lengner CJ, Hovhannisyan H, Bhat RA, Bodine PVN, Komm BS, et al. Canonical WNT signaling promotes osteogenesis by directly stimulating *Runx2* gene expression. *J. Biol. Chem.* 2005 sept 30;280(39):33132-40.
25. Cawthorn WP, Bree AJ, Yao Y, Du B, Hemati N, Martinez-Santibañez G, et al. *Wnt6*, *Wnt10a* and *Wnt10b* inhibit adipogenesis and stimulate osteoblastogenesis through a  $\beta$ -catenin-dependent mechanism. *Bone.* 2012 févr;50(2):477-89.
26. Itoh S, Udagawa N, Takahashi N, Yoshitake F, Narita H, Ebisu S, et al. A critical role for interleukin-6 family-mediated Stat3 activation in osteoblast differentiation and bone formation. *Bone.* 2006 sept;39(3):505-12.
27. Franz-Odenaal TA, Hall BK, Witten PE. Buried alive: how osteoblasts become osteocytes. *Dev. Dyn.* 2006 janv;235(1):176-90.
28. 181.pdf (Objet application/pdf) [Internet]. [cité 2012 juin 22]. Available de: <http://ticem.sante.univ-nantes.fr/ressources/181.pdf>

29. Wennberg C, Hessle L, Lundberg P, Mauro S, Narisawa S, Lerner UH, et al. Functional characterization of osteoblasts and osteoclasts from alkaline phosphatase knockout mice. *J. Bone Miner. Res.* 2000 oct;15(10):1879-88.
30. Malaval L, Aubin JE, Vico L. Role of the small integrin-binding ligand N-linked glycoprotein (SIBLING), bone sialoprotein (BSP) in bone development and remodeling. *Osteoporosis International.* 2009 avr 2;20(6):1077-80.
31. Glowacki J, Rey C, Glimcher MJ, Cox KA, Lian J. A role for osteocalcin in osteoclast differentiation. *J. Cell. Biochem.* 1991 mars;45(3):292-302.
32. Candelieri GA, Liu F, Aubin JE. Individual osteoblasts in the developing calvaria express different gene repertoires. *Bone.* 2001 avr;28(4):351-61.
33. Kanaan RA, Kanaan LA. Transforming growth factor beta1, bone connection. *Med. Sci. Monit.* 2006 août;12(8):RA164-169.
34. Chen G, Deng C, Li Y-P. TGF- $\beta$  and BMP signaling in osteoblast differentiation and bone formation. *Int. J. Biol. Sci.* 2012;8(2):272-88.
35. Yamaguchi A, Komori T, Suda T. Regulation of osteoblast differentiation mediated by bone morphogenetic proteins, hedgehogs, and Cbfa1. *Endocr. Rev.* 2000 août;21(4):393-411.
36. Marie PJ. Fibroblast growth factor signaling controlling bone formation: an update. *Gene.* 2012 avr 25;498(1):1-4.
37. Montero A, Okada Y, Tomita M, Ito M, Tsurukami H, Nakamura T, et al. Disruption of the fibroblast growth factor-2 gene results in decreased bone mass and bone formation. *J. Clin. Invest.* 2000 avr;105(8):1085-93.
38. Matsuo K. Cross-talk among bone cells. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension.* 2009 juill;18(4):292-7.
39. Ståhle-Bäckdahl M, Sandstedt B, Bruce K, Lindahl A, Jiménez MG, Vega JA, et al. Collagenase-3 (MMP-13) is expressed during human fetal ossification and re-expressed in postnatal bone remodeling and in rheumatoid arthritis. *Lab. Invest.* 1997 mai;76(5):717-28.
40. Manolagas SC. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr. Rev.* 2000 avr;21(2):115-37.
41. Chambers TJ, Fuller K. Bone cells predispose bone surfaces to resorption by exposure of mineral to osteoclastic contact. *J. Cell. Sci.* 1985 juin;76:155-65.
42. Sims NA, Gooi JH. Bone remodeling: Multiple cellular interactions required for coupling of bone formation and resorption. *Semin. Cell Dev. Biol.* 2008 oct;19(5):444-51.
43. Palumbo C. A three-dimensional ultrastructural study of osteoid-osteocytes in the tibia of chick embryos. *Cell Tissue Res.* 1986;246(1):125-31.

44. Knothe Tate ML, Adamson JR, Tami AE, Bauer TW. The osteocyte. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2004 janv;36(1):1-8.
45. Noble BS, Peet N, Stevens HY, Brabbs A, Mosley JR, Reilly GC, et al. Mechanical loading: biphasic osteocyte survival and targeting of osteoclasts for bone destruction in rat cortical bone. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* 2003 avr;284(4):C934-943.
46. Brounais B, David E, Chipoy C, Trichet V, Ferré V, Charrier C, et al. Long term oncostatin M treatment induces an osteocyte-like differentiation on osteosarcoma and calvaria cells. *Bone.* 2009 mai;44(5):830-9.
47. Civitelli R. Cell-cell communication in the osteoblast/osteocyte lineage. *Arch. Biochem. Biophys.* 2008 mai 15;473(2):188-92.
48. Genetos DC, Kephart CJ, Zhang Y, Yellowley CE, Donahue HJ. Oscillating fluid flow activation of gap junction hemichannels induces ATP release from MLO-Y4 osteocytes. *J. Cell. Physiol.* 2007 juill;212(1):207-14.
49. Galli C, Passeri G, Macaluso GM. Osteocytes and WNT: the mechanical control of bone formation. *J. Dent. Res.* 2010 avr;89(4):331-43.
50. Winkler DG, Sutherland MK, Geoghegan JC, Yu C, Hayes T, Skonier JE, et al. Osteocyte control of bone formation via sclerostin, a novel BMP antagonist. *EMBO J.* 2003 déc 1;22(23):6267-76.
51. Rousselle AV, Heymann D. Osteoclastic acidification pathways during bone resorption. *Bone.* 2002;30(4):533-40.
52. Suda T, Takahashi N, Martin TJ. Modulation of osteoclast differentiation. *Endocr. Rev.* 1992 févr;13(1):66-80.
53. Yavropoulou MP, Yovos JG. Osteoclastogenesis--current knowledge and future perspectives. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2008 sept;8(3):204-16.
54. Hattersley G, Chambers TJ. Generation of osteoclasts from hemopoietic cells and a multipotential cell line in vitro. *J. Cell. Physiol.* 1989 sept;140(3):478-82.
55. Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, et al. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell.* 1998 avr 17;93(2):165-76.
56. Suda T, Takahashi N, Udagawa N, Jimi E, Gillespie MT, Martin TJ. Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocr. Rev.* 1999 juin;20(3):345-57.
57. Nicholson GC, Malakellis M, Collier FM, Cameron PU, Holloway WR, Gough TJ, et al. Induction of osteoclasts from CD14-positive human peripheral blood mononuclear cells by receptor activator of nuclear factor kappaB ligand (RANKL). *Clin. Sci.* 2000 août;99(2):133-40.
58. Massey HM, Flanagan AM. Human osteoclasts derive from CD14-positive monocytes. *Br. J. Haematol.* 1999 juill;106(1):167-70.

59. Sørensen MG, Henriksen K, Schaller S, Henriksen DB, Nielsen FC, Dziegiel MH, et al. Characterization of osteoclasts derived from CD14<sup>+</sup> monocytes isolated from peripheral blood. *J. Bone Miner. Metab.* 2007;25(1):36-45.
60. Rivollier A, Mazzorana M, Tebib J, Piperno M, Aitsiselmi T, Rabourdin-Combe C, et al. Immature dendritic cell transdifferentiation into osteoclasts: a novel pathway sustained by the rheumatoid arthritis microenvironment. *Blood.* 2004 déc 15;104(13):4029-37.
61. Wakkach A, Mansour A, Dacquin R, Coste E, Jurdic P, Carle GF, et al. Bone marrow microenvironment controls the in vivo differentiation of murine dendritic cells into osteoclasts. *Blood.* 2008 déc 15;112(13):5074-83.
62. Lin H, Lee E, Hestir K, Leo C, Huang M, Bosch E, et al. Discovery of a cytokine and its receptor by functional screening of the extracellular proteome. *Science.* 2008 mai 9;320(5877):807-11.
63. Chen Z, Buki K, Vääräniemi J, Gu G, Väänänen HK. The critical role of IL-34 in osteoclastogenesis. *PLoS ONE.* 2011;6(4):e18689.
64. Chemel M, Le Goff B, Brion R, Cozic C, Berreur M, Amiaud J, et al. Interleukin 34 expression is associated with synovitis severity in rheumatoid arthritis patients. *Ann. Rheum. Dis.* 2012 janv;71(1):150-4.
65. Baud'huin M, Renault R, Charrier C, Riet A, Moreau A, Brion R, et al. Interleukin-34 is expressed by giant cell tumours of bone and plays a key role in RANKL-induced osteoclastogenesis. *J. Pathol.* 2010 mai;221(1):77-86.
66. Lakkakorpi PT, Väänänen HK. Cytoskeletal changes in osteoclasts during the resorption cycle. *Microsc. Res. Tech.* 1996 févr 1;33(2):171-81.
67. Holtrop ME, King GJ. The ultrastructure of the osteoclast and its functional implications. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 1977 avr;(123):177-96.
68. Georges S, Ruiz Velasco C, Trichet V, Fortun Y, Heymann D, Padrines M. Proteases and bone remodelling. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2009 févr;20(1):29-41.
69. Theoleyre S, Wittrant Y, Tat SK, Fortun Y, Redini F, Heymann D. The molecular triad OPG/RANK/RANKL: involvement in the orchestration of pathophysiological bone remodeling. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2004 déc;15(6):457-75.
70. Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR, Morony S, Tarpley J, Capparelli C, et al. osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev.* 1998 mai 1;12(9):1260-8.
71. Min H, Morony S, Sarosi I, Dunstan CR, Capparelli C, Scully S, et al. Osteoprotegerin reverses osteoporosis by inhibiting endosteal osteoclasts and prevents vascular calcification by blocking a process resembling osteoclastogenesis. *J. Exp. Med.* 2000 août 21;192(4):463-74.
72. Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature.* 2003 mai 15;423(6937):337-42.

73. Lee S-K, Lorenzo JA. Regulation of receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand and osteoprotegerin mRNA expression by parathyroid hormone is predominantly mediated by the protein kinase a pathway in murine bone marrow cultures. *Bone*. 2002 juill;31(1):252-9.
74. Ray Boot-Handford | Wellcome Trust Centre For Cell-Matrix Research [Internet]. [cité 2012 juill 15]. Available de: <http://www.wellcome-matrix.org/research-groups/ray-boothandford.html>
75. Pacifici R. Cytokines, estrogen, and postmenopausal osteoporosis--the second decade. *Endocrinology*. 1998 juin;139(6):2659-61.
76. Turner CH, Pavalko FM. Mechanotransduction and functional response of the skeleton to physical stress: the mechanisms and mechanics of bone adaptation. *J Orthop Sci*. 1998;3(6):346-55.
77. Marie PJ. The calcium-sensing receptor in bone cells: a potential therapeutic target in osteoporosis. *Bone*. 2010 mars;46(3):571-6.
78. Pederson L, Ruan M, Westendorf JJ, Khosla S, Oursler MJ. Regulation of bone formation by osteoclasts involves Wnt/BMP signaling and the chemokine sphingosine-1-phosphate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2008 déc 30;105(52):20764-9.
79. Wu X, McKenna MA, Feng X, Nagy TR, McDonald JM. Osteoclast apoptosis: the role of Fas in vivo and in vitro. *Endocrinology*. 2003 déc;144(12):5545-55.
80. Andersen TL, Sondergaard TE, Skorzynska KE, Dagnaes-Hansen F, Plesner TL, Hauge EM, et al. A Physical Mechanism for Coupling Bone Resorption and Formation in Adult Human Bone. *The American Journal of Pathology*. 2009 janv;174(1):239-47.
81. Gheron Robey P. The biochemistry of bone. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* 1989 déc;18(4):858-902.
82. Canalis E, Economides AN, Gazzerro E. Bone Morphogenetic Proteins, Their Antagonists, and the Skeleton. *Endocrine Reviews*. 2003 janv 4;24(2):218-35.
83. Yakar S, Courtland H-W, Clemmons D. IGF-1 and bone: New discoveries from mouse models. *J. Bone Miner. Res.* 2010 déc;25(12):2543-52.
84. Lind M, Schumacker B, Søballe K, Keller J, Melsen F, Bünger C. Transforming growth factor-beta enhances fracture healing in rabbit tibiae. *Acta Orthop Scand*. 1993 oct;64(5):553-6.
85. Nielsen HM, Andreassen TT, Ledet T, Oxlund H. Local injection of TGF-beta increases the strength of tibial fractures in the rat. *Acta Orthop Scand*. 1994 févr;65(1):37-41.
86. Karsenty G. Convergence between bone and energy homeostases: leptin regulation of bone mass. *Cell Metab*. 2006 nov;4(5):341-8.

87. Ducy P, Amling M, Takeda S, Priemel M, Schilling AF, Beil FT, et al. Leptin inhibits bone formation through a hypothalamic relay: a central control of bone mass. *Cell*. 2000 janv 21;100(2):197-207.
88. Jilka RL. Molecular and cellular mechanisms of the anabolic effect of intermittent PTH. *Bone*. 2007 juin;40(6):1434-46.
89. de Paula FJA, Rosen CJ. Back to the future: revisiting parathyroid hormone and calcitonin control of bone remodeling. *Horm. Metab. Res.* 2010 mai;42(5):299-306.
90. Robling AG, Castillo AB, Turner CH. Biomechanical and Molecular Regulation of Bone Remodeling. *Annual Review of Biomedical Engineering*. 2006;8(1):455-98.
91. Parfitt AM. The mechanism of coupling: a role for the vasculature. *Bone*. 2000 avr;26(4):319-23.
92. Hauge EM, Qvesel D, Eriksen EF, Mosekilde L, Melsen F. Cancellous Bone Remodeling Occurs in Specialized Compartments Lined by Cells Expressing Osteoblastic Markers. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2001;16(9):1575-82.
93. Jiang JX, Siller-Jackson AJ, Burra S. Roles of gap junctions and hemichannels in bone cell functions and in signal transmission of mechanical stress. *Front. Biosci.* 2007;12:1450-62.
94. Khosla S, Westendorf JJ, Oursler MJ. Building bone to reverse osteoporosis and repair fractures. *Journal of Clinical Investigation*. 2008 févr 1;118(2):421-8.
95. Everts V, Delaissé JM, Korper W, Jansen DC, Tigchelaar-Gutter W, Saftig P, et al. The bone lining cell: its role in cleaning Howship's lacunae and initiating bone formation. *J. Bone Miner. Res.* 2002 janv;17(1):77-90.
96. Bonewald LF. Osteocyte messages from a bony tomb. *Cell Metab.* 2007 juin;5(6):410-1.
97. Goldring SR. Pathogenesis of bone and cartilage destruction in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 2003 mai;42 Suppl 2:ii11-16.
98. Tauber AI. Metchnikoff and the phagocytosis theory. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2003 nov 1;4(11):897-901.
99. Passlick B, Flieger D, Ziegler-Heitbrock HW. Identification and Characterization of a Novel Monocyte Subpopulation in Human Peripheral Blood. *Blood*. 1989 nov 15;74(7):2527-34.
100. Ziegler-Heitbrock HW, Passlick B, Flieger D. The monoclonal antimonocyte antibody My4 stains B lymphocytes and two distinct monocyte subsets in human peripheral blood. *Hybridoma*. 1988 déc;7(6):521-7.
101. Szaflarska A, Baj-Krzyworzeka M, Siedlar M, Węglarczyk K, Ruggiero I, Hajto B, et al. Antitumor response of CD14+/CD16+ monocyte subpopulation. *Experimental Hematology*. 2004 août;32(8):748-55.

102. Serbina NV, Cherny M, Shi C, Bleau SA, Collins NH, Young JW, et al. Distinct Responses of Human Monocyte Subsets to *Aspergillus Fumigatus* Conidia. *J Immunol.* 2009 août 15;183(4):2678-87.
103. Belge K-U, Dayyani F, Horelt A, Siedlar M, Frankenberger M, Frankenberger B, et al. The Proinflammatory CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>DR<sup>++</sup> Monocytes Are a Major Source of TNF. *J Immunol.* 2002 janv 4;168(7):3536-42.
104. Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat. Rev. Immunol.* 2005 déc;5(12):953-64.
105. Grage-Griebenow E, Flad HD, Ernst M. Heterogeneity of human peripheral blood monocyte subsets. *J. Leukoc. Biol.* 2001 janv;69(1):11-20.
106. Weber C, Belge KU, von Hundelshausen P, Draude G, Steppich B, Mack M, et al. Differential chemokine receptor expression and function in human monocyte subpopulations. *J. Leukoc. Biol.* 2000 mai;67(5):699-704.
107. Ziegler-Heitbrock HW, Fingerle G, Ströbel M, Schraut W, Stelter F, Schütt C, et al. The novel subset of CD14<sup>+</sup>/CD16<sup>+</sup> blood monocytes exhibits features of tissue macrophages. *Eur. J. Immunol.* 1993 sept;23(9):2053-8.
108. Auffray C, Fogg D, Garfa M, Elain G, Join-Lambert O, Kayal S, et al. Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. *Science.* 2007 août 3;317(5838):666-70.
109. Geissmann F, Jung S, Littman DR. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity.* 2003 juill;19(1):71-82.
110. Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature Reviews Immunology.* 2008 déc 1;8(12):958-69.
111. Gordon S, Martinez FO. Alternative Activation of Macrophages: Mechanism and Functions. *Immunity.* 2010 mai 28;32(5):593-604.
112. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.* 2004 déc;25(12):677-86.
113. Kolios G, Valatas V, Kouroumalis E. Role of Kupffer cells in the pathogenesis of liver disease. *World J. Gastroenterol.* 2006 déc 14;12(46):7413-20.
114. Austyn JM, Gordon S. F4/80, a monoclonal antibody directed specifically against the mouse macrophage. *European Journal of Immunology.* 1981;11(10):805-15.
115. Lean J., Matsuo K, Fox S., Fuller K, Gibson F., Draycott G, et al. Osteoclast lineage commitment of bone marrow precursors through expression of membrane-bound TRANCE. *Bone.* 2000 juill;27(1):29-40.
116. Chang MK, Raggatt L-J, Alexander KA, Kuliwaba JS, Fazzalari NL, Schroder K, et al. Osteal tissue macrophages are intercalated throughout human and mouse bone lining

- tissues and regulate osteoblast function in vitro and in vivo. *J. Immunol.* 2008 juill 15;181(2):1232-44.
117. Hume DA, Loutit JF, Gordon S. The mononuclear phagocyte system of the mouse defined by immunohistochemical localization of antigen F4/80: macrophages of bone and associated connective tissue. *J. Cell. Sci.* 1984 mars;66:189-94.
  118. Schofield R. The stem cell system. *Biomed. Pharmacother.* 1983;37(8):375-80.
  119. Chow A, Lucas D, Hidalgo A, Méndez-Ferrer S, Hashimoto D, Scheiermann C, et al. Bone marrow CD169<sup>+</sup> macrophages promote the retention of hematopoietic stem and progenitor cells in the mesenchymal stem cell niche. *J. Exp. Med.* 2011 févr 14;208(2):261-71.
  120. Winkler IG, Sims NA, Pettit AR, Barbier V, Nowlan B, Helwani F, et al. Bone marrow macrophages maintain hematopoietic stem cell (HSC) niches and their depletion mobilizes HSCs. *Blood.* 2010 déc 2;116(23):4815-28.
  121. Mansour A, Abou-Ezzi G, Sitnicka E, Jacobsen SEW, Wakkach A, Blin-Wakkach C. Osteoclasts promote the formation of hematopoietic stem cell niches in the bone marrow. *J. Exp. Med.* 2012 mars 12;209(3):537-49.
  122. Blanc KL, Mougiakakos D. Multipotent mesenchymal stromal cells and the innate immune system. *Nature Reviews Immunology.* 2012 avr 25;12(5):383-96.
  123. Chen L, Tredget EE, Wu PYG, Wu Y. Paracrine factors of mesenchymal stem cells recruit macrophages and endothelial lineage cells and enhance wound healing. *PLoS ONE.* 2008;3(4):e1886.
  124. Kim J, Hematti P. Mesenchymal stem cell-educated macrophages: a novel type of alternatively activated macrophages. *Exp. Hematol.* 2009 déc;37(12):1445-53.
  125. Nishimura K, Leelahavanichkul A, Yuen PST, Mayer B, Parmelee A, Doi K, et al. Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E<sub>2</sub>-dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production. *Nature Medicine.* 2008;15(1):42-9.
  126. Assoian RK, Fleurdelys BE, Stevenson HC, Miller PJ, Madtes DK, Raines EW, et al. Expression and secretion of type beta transforming growth factor by activated human macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1987 sept;84(17):6020-4.
  127. Takahashi F, Takahashi K, Shimizu K, Cui R, Tada N, Takahashi H, et al. Osteopontin is strongly expressed by alveolar macrophages in the lungs of acute respiratory distress syndrome. *Lung.* 2004;182(3):173-85.
  128. Kreutz M, Andreesen R, Krause SW, Szabo A, Ritz E, Reichel H. 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> production and vitamin D<sub>3</sub> receptor expression are developmentally regulated during differentiation of human monocytes into macrophages. *Blood.* 1993 août 15;82(4):1300-7.

129. Champagne CM, Takebe J, Offenbacher S, Cooper LF. Macrophage cell lines produce osteoinductive signals that include bone morphogenetic protein-2. *Bone*. 2002 janv;30(1):26-31.
130. Shioi A, Katagi M, Okuno Y, Mori K, Jono S, Koyama H, et al. Induction of Bone-Type Alkaline Phosphatase in Human Vascular Smooth Muscle Cells Roles of Tumor Necrosis Factor-A and Oncostatin M Derived From Macrophages. *Circulation Research*. 2002 déc 7;91(1):9-16.
131. Grundnes O, Reikeraas O. Effects of macrophage activation on bone healing. *J Orthop Sci*. 2000;5(3):243-7.
132. Thammasitboon K, Goldring SR, Boch JA. Role of macrophages in LPS-induced osteoblast and PDL cell apoptosis. *Bone*. 2006 juin;38(6):845-52.
133. Burnett SH, Kershen EJ, Zhang J, Zeng L, Straley SC, Kaplan AM, et al. Conditional macrophage ablation in transgenic mice expressing a Fas-based suicide gene. *J. Leukoc. Biol*. 2004 avr;75(4):612-23.
134. Zhao C, Irie N, Takada Y, Shimoda K, Miyamoto T, Nishiwaki T, et al. Bidirectional ephrinB2-EphB4 signaling controls bone homeostasis. *Cell Metab*. 2006 août;4(2):111-21.
135. Pettit AR, Chang MK, Hume DA, Raggatt L-J. Osteal macrophages: A new twist on coupling during bone dynamics. *Bone*. 2008 déc;43(6):976-82.
136. Zreiqat H, Kumar RK, Markovic B, Zicat B, Howlett CR. Macrophages at the skeletal tissue-device interface of loosened prosthetic devices express bone-related genes and their products. *J Biomed Mater Res A*. 2003 avr 1;65(1):109-17.
137. Hankemeier S, Grässel S, Plenz G, Spiegel H., Bruckner P, Probst A. Alteration of fracture stability influences chondrogenesis, osteogenesis and immigration of macrophages. *Journal of Orthopaedic Research*. 2001 juill;19(4):531-8.
138. Tintut Y, Patel J, Territo M, Saini T, Parhami F, Demer LL. Monocyte/Macrophage Regulation of Vascular Calcification In Vitro. *Circulation*. 2002 mai 2;105(5):650-5.
139. Blom AB, van Lent PLEM, Holthuysen AEM, van der Kraan PM, Roth J, van Rooijen N, et al. Synovial lining macrophages mediate osteophyte formation during experimental osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2004 août;12(8):627-35.
140. Van Lent PLEM, Blom AB, Van Der Kraan P, Holthuysen AEM, Vitters E, Van Rooijen N, et al. Crucial role of synovial lining macrophages in the promotion of transforming growth factor  $\beta$ -mediated osteophyte formation. *Arthritis & Rheumatism*. 2004;50(1):103-11.
141. Kaneko M, Tomita T, Nakase T, Ohsawa Y, Seki H, Takeuchi E, et al. Expression of proteinases and inflammatory cytokines in subchondral bone regions in the destructive joint of rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 2001 mars;40(3):247-55.

142. Alexander KA, Chang MK, Maylin ER, Kohler T, Müller R, Wu AC, et al. Osteal macrophages promote in vivo intramembranous bone healing in a mouse tibial injury model. *J. Bone Miner. Res.* 2011 juill;26(7):1517-32.
143. Sarahrudi K, Mousavi M, Grossschmidt K, Sela N, König F, Vécsei V, et al. The impact of colony-stimulating factor-1 on fracture healing: an experimental study. *J. Orthop. Res.* 2009 janv;27(1):36-41.
144. Ulrich-Vinther M, Andreassen TT. Osteoprotegerin treatment impairs remodeling and apparent material properties of callus tissue without influencing structural fracture strength. *Calcif. Tissue Int.* 2005 avr;76(4):280-6.
145. Gerstenfeld LC, Sacks DJ, Pelis M, Mason ZD, Graves DT, Barrero M, et al. Comparison of effects of the bisphosphonate alendronate versus the RANKL inhibitor denosumab on murine fracture healing. *J. Bone Miner. Res.* 2009 févr;24(2):196-208.
146. McDonald MM, Dulai S, Godfrey C, Amanat N, Szynda T, Little DG. Bolus or weekly zoledronic acid administration does not delay endochondral fracture repair but weekly dosing enhances delays in hard callus remodeling. *Bone.* 2008 oct;43(4):653-62.
147. Wahl SM, McCartney-Francis N, Allen JB, Dougherty EB, Dougherty SF. Macrophage production of TGF-beta and regulation by TGF-beta. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1990;593:188-96.
148. Okazaki T, Ebihara S, Takahashi H, Asada M, Kanda A, Sasaki H. Macrophage colony-stimulating factor induces vascular endothelial growth factor production in skeletal muscle and promotes tumor angiogenesis. *J. Immunol.* 2005 juin 15;174(12):7531-8.
149. Elbeshir EI. Spontaneous regeneration of the mandibular bone following hemimandibulectomy. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 1990 avr;28(2):128-30.
150. Bucholz RW, Heckman JD, Court-Brown C, Tornetta P, Koval KJ, Wirth MA, éditeurs. *Rockwood and Green's Fractures in Adults: Rockwood, Green, and Wilkins' Fractures, 2 Volume Set. Sixth.* Lippincott Williams & Wilkins; 2005.
151. McKibbin B. The biology of fracture healing in long bones. *J Bone Joint Surg Br.* 1978 mai;60-B(2):150-62.
152. Lienemann PS, Lutolf MP, Ehrbar M. Biomimetic hydrogels for controlled biomolecule delivery to augment bone regeneration. *Advanced Drug Delivery Reviews* [Internet]. [cité 2012 juill 15]; Available de: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169409X12001068>
153. Kolar P, Schmidt-Bleek K, Schell H, Gaber T, Toben D, Schmidmaier G, et al. The early fracture hematoma and its potential role in fracture healing. *Tissue Eng Part B Rev.* 2010 août;16(4):427-34.
154. Grundnes O, Reikerås O. The importance of the hematoma for fracture healing in rats. *Acta Orthop Scand.* 1993 juin;64(3):340-2.

155. Chung R, Cool JC, Scherer MA, Foster BK, Xian CJ. Roles of neutrophil-mediated inflammatory response in the bony repair of injured growth plate cartilage in young rats. *J. Leukoc. Biol.* 2006 déc;80(6):1272-80.
156. Xing Z, Lu C, Hu D, Yu Y -y., Wang X, Colnot C, et al. Multiple roles for CCR2 during fracture healing. *Disease Models & Mechanisms.* 2010 mars 30;3(7-8):451-8.
157. Andrew JG, Andrew SM, Freemont AJ, Marsh DR. Inflammatory cells in normal human fracture healing. *Acta Orthop Scand.* 1994 août;65(4):462-6.
158. Kon T, Cho TJ, Aizawa T, Yamazaki M, Nooh N, Graves D, et al. Expression of osteoprotegerin, receptor activator of NF-kappaB ligand (osteoprotegerin ligand) and related proinflammatory cytokines during fracture healing. *J. Bone Miner. Res.* 2001 juin;16(6):1004-14.
159. Ai-Aql ZS, Alagl AS, Graves DT, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. Molecular mechanisms controlling bone formation during fracture healing and distraction osteogenesis. *J. Dent. Res.* 2008 févr;87(2):107-18.
160. Lienau J, Schmidt-Bleek K, Peters A, Haschke F, Duda GN, Perka C, et al. Differential regulation of blood vessel formation between standard and delayed bone healing. *J. Orthop. Res.* 2009 sept;27(9):1133-40.
161. Decker B, Bartels H, Decker S. Relationships between endothelial cells, pericytes, and osteoblasts during bone formation in the sheep femur following implantation of tricalciumphosphate-ceramic. *Anat. Rec.* 1995 juill;242(3):310-20.
162. Kirton JP, Wilkinson FL, Canfield AE, Alexander MY. Dexamethasone downregulates calcification-inhibitor molecules and accelerates osteogenic differentiation of vascular pericytes: implications for vascular calcification. *Circ. Res.* 2006 mai 26;98(10):1264-72.
163. Granero-Moltó F, Weis JA, Miga MI, Landis B, Myers TJ, O'Rear L, et al. Regenerative Effects of Transplanted Mesenchymal Stem Cells in Fracture Healing. *STEM CELLS.* 2009;27(8):1887-98.
164. Kellinsalmi M, Parikka V, Risteli J, Hentunen T, Leskelä H-V, Lehtonen S, et al. Inhibition of cyclooxygenase-2 down-regulates osteoclast and osteoblast differentiation and favours adipocyte formation in vitro. *Eur. J. Pharmacol.* 2007 oct 31;572(2-3):102-10.
165. Claes L, Recknagel S, Ignatius A. Fracture healing under healthy and inflammatory conditions. *Nat Rev Rheumatol.* 2012 mars;8(3):133-43.
166. BASSETT CA, HERRMANN I. Influence of oxygen concentration and mechanical factors on differentiation of connective tissues in vitro. *Nature.* 1961 avr 29;190:460-1.
167. Claes L, Eckert-Hübner K, Augat P. The effect of mechanical stability on local vascularization and tissue differentiation in callus healing. *J. Orthop. Res.* 2002 sept;20(5):1099-105.

168. Phillips AM. Overview of the fracture healing cascade. *Injury*. 2005 nov;36 Suppl 3:S5-7.
169. Melnyk M, Henke T, Claes L, Augat P. Revascularisation during fracture healing with soft tissue injury. *Arch Orthop Trauma Surg*. 2008 oct;128(10):1159-65.
170. Glass GE, Chan JK, Freidin A, Feldmann M, Horwood NJ, Nanchahal J. TNF- $\alpha$  Promotes Fracture Repair by Augmenting the Recruitment and Differentiation of Muscle-Derived Stromal Cells. *PNAS*. 2011 janv 25;108(4):1585-90.
171. Meling T, Harboe K, Søreide K. Incidence of traumatic long-bone fractures requiring in-hospital management: a prospective age- and gender-specific analysis of 4890 fractures. *Injury*. 2009 nov;40(11):1212-9.
172. Duarte LR. The stimulation of bone growth by ultrasound. *Arch Orthop Trauma Surg*. 1983;101(3):153-9.
173. Azuma Y, Ito M, Harada Y, Takagi H, Ohta T, Jingushi S. Low-Intensity Pulsed Ultrasound Accelerates Rat Femoral Fracture Healing by Acting on the Various Cellular Reactions in the Fracture Callus. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2001;16(4):671-80.
174. Yang K-H, Parvizi J, Wang S-J, Lewallen DG, Kinnick RR, Greenleaf JF, et al. Exposure to low-intensity ultrasound increases aggrecan gene expression in a rat femur fracture model. *Journal of Orthopaedic Research*. 1996;14(5):802-9.
175. Giannoudis PV, Dinopoulos H, Tsiridis E. Bone substitutes: an update. *Injury*. 2005 nov;36 Suppl 3:S20-27.
176. Baron R, Hesse E. Update on bone anabolics in osteoporosis treatment: rationale, current status, and perspectives. *J. Clin. Endocrinol. Metab*. 2012 févr;97(2):311-25.
177. Tam CS, Heersche JN, Murray TM, Parsons JA. Parathyroid hormone stimulates the bone apposition rate independently of its resorptive action: differential effects of intermittent and continuous administration. *Endocrinology*. 1982 févr;110(2):506-12.
178. Neer RM, Arnaud CD, Zanchetta JR, Prince R, Gaich GA, Reginster JY, et al. Effect of parathyroid hormone (1-34) on fractures and bone mineral density in postmenopausal women with osteoporosis. *N. Engl. J. Med*. 2001 mai 10;344(19):1434-41.
179. Manabe T, Mori S, Mashiba T, Kaji Y, Iwata K, Komatsubara S, et al. Human parathyroid hormone (1-34) accelerates natural fracture healing process in the femoral osteotomy model of cynomolgus monkeys. *Bone*. 2007 juin;40(6):1475-82.
180. Alkhiary YM. Enhancement of Experimental Fracture-Healing by Systemic Administration of Recombinant Human Parathyroid Hormone (PTH 1-34). *The Journal of Bone and Joint Surgery*. 2005 avr 1;87(4):731-41.
181. Andreassen TT, Willick GE, Morley P, Whitfield JF. Treatment with Parathyroid Hormone hPTH(1-34), hPTH(1-31), and Monocyclic hPTH(1-31) Enhances Fracture Strength and Callus Amount After Withdrawal Fracture Strength and Callus

- Mechanical Quality Continue to Increase. *Calcified Tissue International*. 2004;74(4):351-6.
182. Andreassen TT, Ejersted C, Oxlund H. Intermittent Parathyroid Hormone (1–34) Treatment Increases Callus Formation and Mechanical Strength of Healing Rat Fractures. *Journal of Bone and Mineral Research*. 1999;14(6):960-8.
  183. Rickard DJ, Wang F-L, Rodriguez-Rojas A-M, Wu Z, Trice WJ, Hoffman SJ, et al. Intermittent treatment with parathyroid hormone (PTH) as well as a non-peptide small molecule agonist of the PTH1 receptor inhibits adipocyte differentiation in human bone marrow stromal cells. *Bone*. 2006 déc;39(6):1361-72.
  184. Aspenberg P, Genant HK, Johansson T, Nino AJ, See K, Krohn K, et al. Teriparatide for acceleration of fracture repair in humans: A prospective, randomized, double-blind study of 102 postmenopausal women with distal radial fractures. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2010 févr;25(2):404-14.
  185. Aspenberg P, Johansson T. Teriparatide improves early callus formation in distal radial fractures. *Acta Orthop*. 2010 avr;81(2):234-6.
  186. Cosman F, Eriksen EF, Recknor C, Miller PD, Guañabens N, Kasperk C, et al. Effects of intravenous zoledronic acid plus subcutaneous teriparatide [rhPTH(1-34)] in postmenopausal osteoporosis. *J. Bone Miner. Res*. 2011 mars;26(3):503-11.
  187. Black DM, Bilezikian JP, Ensrud KE, Greenspan SL, Palermo L, Hue T, et al. One year of alendronate after one year of parathyroid hormone (1-84) for osteoporosis. *N. Engl. J. Med*. 2005 août 11;353(6):555-65.
  188. BROWN EM. The Calcium-Sensing Receptor: Physiology, Pathophysiology and Car-Based Therapeutics. In: Carafoli E, Brini M, Harris R, éditeurs. *Calcium Signalling and Disease* [Internet]. Springer Netherlands; 2008 [cité 2012 juin 17]. p. 139-67. Available de: <http://www.springerlink.com.gate2.inist.fr/content/v587p30168862102/abstract/>
  189. Fitzpatrick LA, Dabrowski CE, Cicconetti G, Gordon DN, Papapoulos S, Bone HG, et al. The Effects of Ronacaleret, a Calcium-Sensing Receptor Antagonist, on Bone Mineral Density and Biochemical Markers of Bone Turnover in Postmenopausal Women with Low Bone Mineral Density. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2011 mai 18;96(8):2441-9.
  190. Choi Y, Arron JR, Townsend MJ. Promising bone-related therapeutic targets for rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 2009 oct;5(10):543-8.
  191. Westendorf JJ, Kahler RA, Schroeder TM. Wnt signaling in osteoblasts and bone diseases. *Gene*. 2004 oct 27;341:19-39.
  192. Robinson JA, Chatterjee-Kishore M, Yaworsky PJ, Cullen DM, Zhao W, Li C, et al. Wnt/beta-catenin signaling is a normal physiological response to mechanical loading in bone. *J. Biol. Chem*. 2006 oct 20;281(42):31720-8.
  193. Chen Y, Whetstone HC, Lin AC, Nadesan P, Wei Q, Poon R, et al. Beta-catenin signaling plays a disparate role in different phases of fracture repair: implications for therapy to improve bone healing. *PLoS Med*. 2007 juill 31;4(7):e249.

194. Spencer GJ, Utting JC, Etheridge SL, Arnett TR, Genever PG. Wnt signalling in osteoblasts regulates expression of the receptor activator of NFkappaB ligand and inhibits osteoclastogenesis in vitro. *J. Cell. Sci.* 2006 avr 1;119(Pt 7):1283-96.
195. Gong Y, Slee RB, Fukai N, Rawadi G, Roman-Roman S, Reginato AM, et al. LDL receptor-related protein 5 (LRP5) affects bone accrual and eye development. *Cell.* 2001 nov 16;107(4):513-23.
196. Little RD, Carulli JP, Del Mastro RG, Dupuis J, Osborne M, Folz C, et al. A mutation in the LDL receptor-related protein 5 gene results in the autosomal dominant high-bone-mass trait. *Am. J. Hum. Genet.* 2002 janv;70(1):11-9.
197. Kato M, Patel MS, Levasseur R, Lobov I, Chang BH-J, Glass DA 2nd, et al. Cbfa1-independent decrease in osteoblast proliferation, osteopenia, and persistent embryonic eye vascularization in mice deficient in Lrp5, a Wnt coreceptor. *J. Cell Biol.* 2002 avr 15;157(2):303-14.
198. Babij P, Zhao W, Small C, Kharode Y, Yaworsky PJ, Bouxsein ML, et al. High bone mass in mice expressing a mutant LRP5 gene. *J. Bone Miner. Res.* 2003 juin;18(6):960-74.
199. Day TF, Guo X, Garrett-Beal L, Yang Y. Wnt/beta-catenin signaling in mesenchymal progenitors controls osteoblast and chondrocyte differentiation during vertebrate skeletogenesis. *Dev. Cell.* 2005 mai;8(5):739-50.
200. Rodda SJ, McMahon AP. Distinct roles for Hedgehog and canonical Wnt signaling in specification, differentiation and maintenance of osteoblast progenitors. *Development.* 2006 août;133(16):3231-44.
201. Glass DA 2nd, Bialek P, Ahn JD, Starbuck M, Patel MS, Clevers H, et al. Canonical Wnt signaling in differentiated osteoblasts controls osteoclast differentiation. *Dev. Cell.* 2005 mai;8(5):751-64.
202. Almeida M, Han L, Bellido T, Manolagas SC, Kousteni S. Wnt proteins prevent apoptosis of both uncommitted osteoblast progenitors and differentiated osteoblasts by beta-catenin-dependent and -independent signaling cascades involving Src/ERK and phosphatidylinositol 3-kinase/AKT. *J. Biol. Chem.* 2005 déc 16;280(50):41342-51.
203. Boland GM, Perkins G, Hall DJ, Tuan RS. Wnt 3a promotes proliferation and suppresses osteogenic differentiation of adult human mesenchymal stem cells. *J. Cell. Biochem.* 2004 déc 15;93(6):1210-30.
204. Zhong N, Gersch RP, Hadjiargyrou M. Wnt signaling activation during bone regeneration and the role of Dishevelled in chondrocyte proliferation and differentiation. *Bone.* 2006 juill;39(1):5-16.
205. Clément-Lacroix P, Ai M, Morvan F, Roman-Roman S, Vayssière B, Belleville C, et al. Lrp5-independent activation of Wnt signaling by lithium chloride increases bone formation and bone mass in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2005 nov 29;102(48):17406-11.

206. Vestergaard P, Rejnmark L, Mosekilde L. Reduced relative risk of fractures among users of lithium. *Calcif. Tissue Int.* 2005 juill;77(1):1-8.
207. Bellido T, Ali AA, Gubrij I, Plotkin LI, Fu Q, O'Brien CA, et al. Chronic elevation of parathyroid hormone in mice reduces expression of sclerostin by osteocytes: a novel mechanism for hormonal control of osteoblastogenesis. *Endocrinology.* 2005 nov;146(11):4577-83.
208. Brunkow ME, Gardner JC, Van Ness J, Paeper BW, Kovacevich BR, Proll S, et al. Bone dysplasia sclerosteosis results from loss of the SOST gene product, a novel cystine knot-containing protein. *Am. J. Hum. Genet.* 2001 mars;68(3):577-89.
209. Balemans W, Ebeling M, Patel N, Van Hul E, Olson P, Dioszegi M, et al. Increased bone density in sclerosteosis is due to the deficiency of a novel secreted protein (SOST). *Hum. Mol. Genet.* 2001 mars 1;10(5):537-43.
210. Li X, Warmington KS, Niu Q-T, Asuncion FJ, Barrero M, Grisanti M, et al. Inhibition of sclerostin by monoclonal antibody increases bone formation, bone mass, and bone strength in aged male rats. *J. Bone Miner. Res.* 2010 déc;25(12):2647-56.
211. Ominsky MS, Li C, Li X, Tan HL, Lee E, Barrero M, et al. Inhibition of sclerostin by monoclonal antibody enhances bone healing and improves bone density and strength of nonfractured bones. *J. Bone Miner. Res.* 2011 mai;26(5):1012-21.
212. Ominsky MS, Vlasseros F, Jolette J, Smith SY, Stouch B, Doellgast G, et al. Two doses of sclerostin antibody in cynomolgus monkeys increases bone formation, bone mineral density, and bone strength. *J. Bone Miner. Res.* 2010 mai;25(5):948-59.
213. Study To Assess Fracture Healing With Sclerostin Antibody - Full Text View - ClinicalTrials.gov [Internet]. [cité 2012 juin 18]. Available de: <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01081678?term=sclerostin+fracture+healing&rank=1>
214. Wang EA, Rosen V, Cordes P, Hewick RM, Kriz MJ, Luxenberg DP, et al. Purification and characterization of other distinct bone-inducing factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1988 déc;85(24):9484-8.
215. Sipe JB, Zhang J, Waits C, Skikne B, Garimella R, Anderson HC. Localization of bone morphogenetic proteins (BMPs)-2, -4, and -6 within megakaryocytes and platelets. *Bone.* 2004 déc;35(6):1316-22.
216. Yamaguchi A, Ishizuya T, Kintou N, Wada Y, Katagiri T, Wozney JM, et al. Effects of BMP-2, BMP-4, and BMP-6 on osteoblastic differentiation of bone marrow-derived stromal cell lines, ST2 and MC3T3-G2/PA6. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1996 mars 18;220(2):366-71.
217. Govender S, Csimma C, Genant HK, Valentin-Opran A, Amit Y, Arbel R, et al. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 for treatment of open tibial fractures: a prospective, controlled, randomized study of four hundred and fifty patients. *J Bone Joint Surg Am.* 2002 déc;84-A(12):2123-34.

218. Giannoudis PV, Tzioupis C. Clinical applications of BMP-7: the UK perspective. *Injury*. 2005 nov;36 Suppl 3:S47-50.
219. Calori GM, Tagliabue L, Gala L, d' Imporzano M, Peretti G, Albisetti W. Application of rhBMP-7 and platelet-rich plasma in the treatment of long bone non-unions: a prospective randomised clinical study on 120 patients. *Injury*. 2008 déc;39(12):1391-402.
220. Katayama Y, Matsuyama Y, Yoshihara H, Sakai Y, Nakamura H, Imagama S, et al. Clinical and radiographic outcomes of posterolateral lumbar spine fusion in humans using recombinant human bone morphogenetic protein-2: an average five-year follow-up study. *Int Orthop*. 2009 août;33(4):1061-7.
221. Valentin-Opran A, Wozney J, Csimma C, Lilly L, Riedel GE. Clinical evaluation of recombinant human bone morphogenetic protein-2. *Clin. Orthop. Relat. Res*. 2002 févr;(395):110-20.
222. Bilic R, Simic P, Jelic M, Stern-Padovan R, Dodig D, van Meerdervoort HP, et al. Osteogenic protein-1 (BMP-7) accelerates healing of scaphoid non-union with proximal pole sclerosis. *Int Orthop*. 2006 avr;30(2):128-34.
223. Geesink RG, Hoefnagels NH, Bulstra SK. Osteogenic activity of OP-1 bone morphogenetic protein (BMP-7) in a human fibular defect. *J Bone Joint Surg Br*. 1999 juill;81(4):710-8.
224. Dean DB, Watson JT, Moed BR, Zhang Z. Role of bone morphogenetic proteins and their antagonists in healing of bone fracture. *Front. Biosci*. 2009;14:2878-88.
225. Gamer LW, Cox K, Carlo JM, Rosen V. Overexpression of BMP3 in the developing skeleton alters endochondral bone formation resulting in spontaneous rib fractures. *Dev. Dyn*. 2009 sept;238(9):2374-81.
226. Itoh N, Ornitz DM. Functional evolutionary history of the mouse Fgf gene family. *Dev. Dyn*. 2008 janv;237(1):18-27.
227. Ornitz DM, Marie PJ. FGF Signaling Pathways in Endochondral and Intramembranous Bone Development and Human Genetic Disease. *Genes Dev*. 2002 juin 15;16(12):1446-65.
228. Schmid GJ, Kobayashi C, Sandell LJ, Ornitz DM. Fibroblast growth factor expression during skeletal fracture healing in mice. *Dev. Dyn*. 2009 mars;238(3):766-74.
229. Cuevas P, de Paz V, Cuevas B, Marin-Martinez J, Picon-Molina M, Fernández-Pereira A, et al. Osteopromotion for cranioplasty: an experimental study in rats using acidic fibroblast growth factor. *Surg Neurol*. 1997 mars;47(3):242-6.
230. Iwaniec UT, Mosekilde L, Mitova-Caneva NG, Thomsen JS, Wronski TJ. Sequential treatment with basic fibroblast growth factor and PTH is more efficacious than treatment with PTH alone for increasing vertebral bone mass and strength in osteopenic ovariectomized rats. *Endocrinology*. 2002 juill;143(7):2515-26.

231. Nakamura T, Hanada K, Tamura M, Shibanushi T, Nigi H, Tagawa M, et al. Stimulation of endosteal bone formation by systemic injections of recombinant basic fibroblast growth factor in rats. *Endocrinology*. 1995 mars;136(3):1276-84.
232. Pun S, Florio CL, Wronski TJ. Anabolic effects of basic fibroblast growth factor in the tibial diaphysis of ovariectomized rats. *Bone*. 2000 août;27(2):197-202.
233. Radomsky ML, Aufdemorte TB, Swain LD, Fox WC, Spiro RC, Poser JW. Novel formulation of fibroblast growth factor-2 in a hyaluronan gel accelerates fracture healing in nonhuman primates. *J. Orthop. Res.* 1999 juill;17(4):607-14.
234. Behr B, Leucht P, Longaker MT, Quarto N. Fgf-9 is required for angiogenesis and osteogenesis in long bone repair. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2010 juin 29;107(26):11853-8.
235. Behr B, Sorkin M, Manu A, Lehnhardt M, Longaker MT, Quarto N. Fgf-18 is required for osteogenesis but not angiogenesis during long bone repair. *Tissue Eng Part A*. 2011 août;17(15-16):2061-9.
236. Nakajima F, Nakajima A, Ogasawara A, Moriya H, Yamazaki M. Effects of a single percutaneous injection of basic fibroblast growth factor on the healing of a closed femoral shaft fracture in the rat. *Calcif. Tissue Int.* 2007 août;81(2):132-8.
237. Nakajima F, Ogasawara A, Goto K, Moriya H, Ninomiya Y, Einhorn TA, et al. Spatial and temporal gene expression in chondrogenesis during fracture healing and the effects of basic fibroblast growth factor. *J. Orthop. Res.* 2001 sept;19(5):935-44.
238. Carano RAD, Filvaroff EH. Angiogenesis and bone repair. *Drug Discov. Today*. 2003 nov 1;8(21):980-9.
239. Hausman MR, Schaffler MB, Majeska RJ. Prevention of fracture healing in rats by an inhibitor of angiogenesis. *Bone*. 2001 déc;29(6):560-4.
240. Peng H, Usas A, Olshanski A, Ho AM, Gearhart B, Cooper GM, et al. VEGF improves, whereas sFlt1 inhibits, BMP2-induced bone formation and bone healing through modulation of angiogenesis. *J. Bone Miner. Res.* 2005 nov;20(11):2017-27.
241. Peng H, Wright V, Usas A, Gearhart B, Shen H-C, Cummins J, et al. Synergistic enhancement of bone formation and healing by stem cell-expressed VEGF and bone morphogenetic protein-4. *J. Clin. Invest.* 2002 sept;110(6):751-9.
242. Street J, Bao M, deGuzman L, Bunting S, Peale FV Jr, Ferrara N, et al. Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2002 juill 23;99(15):9656-61.
243. Geiger F, Lorenz H, Xu W, Szalay K, Kasten P, Claes L, et al. VEGF producing bone marrow stromal cells (BMSC) enhance vascularization and resorption of a natural coral bone substitute. *Bone*. 2007 oct;41(4):516-22.
244. Tarkka T, Sipola A, Jämsä T, Soini Y, Ylä-Herttuala S, Tuukkanen J, et al. Adenoviral VEGF-A gene transfer induces angiogenesis and promotes bone formation in healing osseous tissues. *The Journal of Gene Medicine*. 2003;5(7):560-6.

245. Heldin CH, Westermark B. Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiol. Rev.* 1999 oct;79(4):1283-316.
246. Andrew JG, Hoyland JA, Freemont AJ, Marsh DR. Platelet-derived growth factor expression in normally healing human fractures. *Bone.* 1995 avr;16(4):455-60.
247. McCarthy HS, Williams JHH, Davie MWJ, Marshall MJ. Platelet-derived growth factor stimulates osteoprotegerin production in osteoblastic cells. *J. Cell. Physiol.* 2009 févr;218(2):350-4.
248. Lucarelli E, Beccheroni A, Donati D, Sangiorgi L, Cenacchi A, Del Vento AM, et al. Platelet-derived growth factors enhance proliferation of human stromal stem cells. *Biomaterials.* 2003 août;24(18):3095-100.
249. Claesson-Welsh L, Heldin CH. Platelet-derived growth factor. Three isoforms that bind to two distinct cell surface receptors. *Acta Oncol.* 1989;28(3):331-4.
250. Rasubala L, Yoshikawa H, Nagata K, Iijima T, Ohishi M. Platelet-derived growth factor and bone morphogenetic protein in the healing of mandibular fractures in rats. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 2003 juin;41(3):173-8.
251. Howell TH, Fiorellini JP, Paquette DW, Offenbacher S, Giannobile WV, Lynch SE. A phase I/II clinical trial to evaluate a combination of recombinant human platelet-derived growth factor-BB and recombinant human insulin-like growth factor-I in patients with periodontal disease. *J. Periodontol.* 1997 déc;68(12):1186-93.
252. Behnia H, Khojasteh A, Soleimani M, Tehranchi A, Atashi A. Repair of alveolar cleft defect with mesenchymal stem cells and platelet derived growth factors: a preliminary report. *J Craniomaxillofac Surg.* 2012 janv;40(1):2-7.
253. SHORR E, CARTER AC. The usefulness of strontium as an adjuvant to calcium in the remineralization of the skeleton in man. *Bull Hosp Joint Dis.* 1952 avr;13(1):59-66.
254. Marie PJ, Ammann P, Boivin G, Rey C. Mechanisms of action and therapeutic potential of strontium in bone. *Calcif. Tissue Int.* 2001 sept;69(3):121-9.
255. Meunier PJ, Roux C, Seeman E, Ortolani S, Badurski JE, Spector TD, et al. The effects of strontium ranelate on the risk of vertebral fracture in women with postmenopausal osteoporosis. *N. Engl. J. Med.* 2004 janv 29;350(5):459-68.
256. Marquis P, Roux C, de la Loge C, Diaz-Curiel M, Cormier C, Isaia G, et al. Strontium ranelate prevents quality of life impairment in post-menopausal women with established vertebral osteoporosis. *Osteoporos Int.* 2008 avr;19(4):503-10.
257. Blanchard F, Duplomb L, Baud'huin M, Brounais B. The dual role of IL-6-type cytokines on bone remodeling and bone tumors. *Cytokine & Growth Factor Reviews.* 2009 févr;20(1):19-28.
258. Taga T. Gp130, a shared signal transducing receptor component for hematopoietic and neuropoietic cytokines. *J. Neurochem.* 1996 juill;67(1):1-10.

259. Dillon SR, Sprecher C, Hammond A, Bilsborough J, Rosenfeld-Franklin M, Presnell SR, et al. Interleukin 31, a cytokine produced by activated T cells, induces dermatitis in mice. *Nat. Immunol.* 2004 juill;5(7):752-60.
260. Garbers C, Hermanns HM, Schaper F, Müller-Newen G, Grötzinger J, Rose-John S, et al. Plasticity and cross-talk of Interleukin 6-type cytokines. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2012 juin;23(3):85-97.
261. Grant SL, Begley CG. The oncostatin M signalling pathway: reversing the neoplastic phenotype? *Mol Med Today.* 1999 sept;5(9):406-12.
262. Ichihara M, Hara T, Kim H, Murate T, Miyajima A. Oncostatin M and leukemia inhibitory factor do not use the same functional receptor in mice. *Blood.* 1997 juill 1;90(1):165-73.
263. Tanaka M, Miyahima A. Oncostatin M, a multifunctional cytokine. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology [Internet].* Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; [cité 2012 juin 26]. p. 39-52. Available de: <http://www.springerlink.com/index/10.1007/s10254-003-0013-1>
264. Walker EC, McGregor NE, Poulton IJ, Solano M, Pompolo S, Fernandes TJ, et al. Oncostatin M promotes bone formation independently of resorption when signaling through leukemia inhibitory factor receptor in mice. *J. Clin. Invest.* 2010 févr;120(2):582-92.
265. Darnell JE Jr. STATs and gene regulation. *Science.* 1997 sept 12;277(5332):1630-5.
266. Stahl N, Farruggella TJ, Boulton TG, Zhong Z, Darnell JE Jr, Yancopoulos GD. Choice of STATs and other substrates specified by modular tyrosine-based motifs in cytokine receptors. *Science.* 1995 mars 3;267(5202):1349-53.
267. Hermanns HM, Radtke S, Schaper F, Heinrich PC, Behrmann I. Non-redundant signal transduction of interleukin-6-type cytokines. The adapter protein Shc is specifically recruited to the oncostatin M receptor. *J. Biol. Chem.* 2000 déc 29;275(52):40742-8.
268. Takahashi-Tezuka M, Yoshida Y, Fukada T, Ohtani T, Yamanaka Y, Nishida K, et al. Gab1 acts as an adapter molecule linking the cytokine receptor gp130 to ERK mitogen-activated protein kinase. *Mol. Cell. Biol.* 1998 juill;18(7):4109-17.
269. Burfoot MS, Rogers NC, Watling D, Smith JM, Pons S, Paonessaw G, et al. Janus kinase-dependent activation of insulin receptor substrate 1 in response to interleukin-4, oncostatin M, and the interferons. *J. Biol. Chem.* 1997 sept 26;272(39):24183-90.
270. Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y, et al. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell.* 1997 oct 17;91(2):231-41.
271. Kishimoto T. The biology of interleukin-6. *Blood.* 1989 juill;74(1):1-10.
272. Taga T, Hibi M, Hirata Y, Yamasaki K, Yasukawa K, Matsuda T, et al. Interleukin-6 triggers the association of its receptor with a possible signal transducer, gp130. *Cell.* 1989 août 11;58(3):573-81.

273. Peters M, Müller AM, Rose-John S. Interleukin-6 and soluble interleukin-6 receptor: direct stimulation of gp130 and hematopoiesis. *Blood*. 1998 nov 15;92(10):3495-504.
274. Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, Locksley RM, Stockinger B. TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity*. 2006 févr;24(2):179-89.
275. Baumann H, Gauldie J. The acute phase response. *Immunol. Today*. 1994 févr;15(2):74-80.
276. Appenheimer MM, Girard RA, Chen Q, Wang W-C, Bankert KC, Hardison J, et al. Conservation of IL-6 trans-signaling mechanisms controlling L-selectin adhesion by fever-range thermal stress. *Eur. J. Immunol*. 2007 oct;37(10):2856-67.
277. Madhok R, Crilly A, Watson J, Capell HA. Serum interleukin 6 levels in rheumatoid arthritis: correlations with clinical and laboratory indices of disease activity. *Ann. Rheum. Dis*. 1993 mars;52(3):232-4.
278. Kishimoto T. Interleukin-6: discovery of a pleiotropic cytokine. *Arthritis Res. Ther*. 2006;8 Suppl 2:S2.
279. Ichikawa Y. Differentiation of a cell line of myeloid leukemia. *J. Cell. Physiol*. 1969 déc;74(3):223-34.
280. Heymann D, Rousselle AV. gp130 Cytokine family and bone cells. *Cytokine*. 2000 oct;12(10):1455-68.
281. Owczarek CM, Zhang Y, Layton MJ, Metcalf D, Roberts B, Nicola NA. The unusual species cross-reactivity of the leukemia inhibitory factor receptor alpha-chain is determined primarily by the immunoglobulin-like domain. *J. Biol. Chem*. 1997 sept 19;272(38):23976-85.
282. Humphrey RK, Beattie GM, Lopez AD, Bucay N, King CC, Firpo MT, et al. Maintenance of pluripotency in human embryonic stem cells is STAT3 independent. *Stem Cells*. 2004;22(4):522-30.
283. Cartwright P, McLean C, Sheppard A, Rivett D, Jones K, Dalton S. LIF/STAT3 controls ES cell self-renewal and pluripotency by a Myc-dependent mechanism. *Development*. 2005 mars;132(5):885-96.
284. Metcalfe SM. Axotrophin and leukaemia inhibitory factor (LIF) in transplantation tolerance. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci*. 2005 sept 29;360(1461):1687-94.
285. Szekeres-Bartho J, Wilczynski JR, Basta P, Kalinka J. Role of progesterone and progestin therapy in threatened abortion and preterm labour. *Front. Biosci*. 2008;13:1981-90.
286. Viillard JF, Taupin JL, Miossec V, Pellegrin JL, Moreau BL. Analysis of interleukin-6, interleukin-10 and leukemia inhibitory factor (LIF) production by peripheral blood cells from patients with systemic lupus erythematosus identifies LIF as a potential marker of disease activity. *Eur. Cytokine Netw*. 1999 mars;10(1):17-24.

287. Menkhorst E, Zhang J-G, Sims NA, Morgan PO, Soo P, Poulton IJ, et al. Vaginally administered PEGylated LIF antagonist blocked embryo implantation and eliminated non-target effects on bone in mice. *PLoS ONE*. 2011;6(5):e19665.
288. Grenier A, Dehoux M, Boutten A, Arce-Vicioso M, Durand G, Gougerot-Pocidal MA, et al. Oncostatin M production and regulation by human polymorphonuclear neutrophils. *Blood*. 1999 févr 15;93(4):1413-21.
289. Suda T, Chida K, Todate A, Ide K, Asada K, Nakamura Y, et al. Oncostatin M production by human dendritic cells in response to bacterial products. *Cytokine*. 2002 mars 21;17(6):335-40.
290. Queen MM, Ryan RE, Holzer RG, Keller-Peck CR, Jorcyk CL. Breast cancer cells stimulate neutrophils to produce oncostatin M: potential implications for tumor progression. *Cancer Res*. 2005 oct 1;65(19):8896-904.
291. Yao L, Pan J, Setiadi H, Patel KD, McEver RP. Interleukin 4 or oncostatin M induces a prolonged increase in P-selectin mRNA and protein in human endothelial cells. *J. Exp. Med*. 1996 juill 1;184(1):81-92.
292. Brown TJ, Rowe JM, Liu JW, Shoyab M. Regulation of IL-6 expression by oncostatin M. *J. Immunol*. 1991 oct 1;147(7):2175-80.
293. Richards CD, Brown TJ, Shoyab M, Baumann H, Gauldie J. Recombinant oncostatin M stimulates the production of acute phase proteins in HepG2 cells and rat primary hepatocytes in vitro. *J. Immunol*. 1992 mars 15;148(6):1731-6.
294. Langdon C, Kerr C, Tong L, Richards CD. Oncostatin M regulates eotaxin expression in fibroblasts and eosinophilic inflammation in C57BL/6 mice. *J. Immunol*. 2003 janv 1;170(1):548-55.
295. Boniface K, Diveu C, Morel F, Pedretti N, Froger J, Ravon E, et al. Oncostatin M secreted by skin infiltrating T lymphocytes is a potent keratinocyte activator involved in skin inflammation. *J. Immunol*. 2007 avr 1;178(7):4615-22.
296. de Hooge ASK, van de Loo FAJ, Bennink MB, de Jong DS, Arntz OJ, Lubberts E, et al. Adenoviral transfer of murine oncostatin M elicits periosteal bone apposition in knee joints of mice, despite synovial inflammation and up-regulated expression of interleukin-6 and receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand. *Am. J. Pathol*. 2002 mai;160(5):1733-43.
297. Li WQ, Dehnade F, Zafarullah M. Oncostatin M-induced matrix metalloproteinase and tissue inhibitor of metalloproteinase-3 genes expression in chondrocytes requires Janus kinase/STAT signaling pathway. *J. Immunol*. 2001 mars 1;166(5):3491-8.
298. Richards CD, Langdon C, Botelho F, Brown TJ, Agro A. Oncostatin M inhibits IL-1-induced expression of IL-8 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by synovial and lung fibroblasts. *J. Immunol*. 1996 janv 1;156(1):343-9.
299. Mukoyama Y, Hara T, Xu M, Tamura K, Donovan PJ, Kim H, et al. In vitro expansion of murine multipotential hematopoietic progenitors from the embryonic aorta-gonad-mesonephros region. *Immunity*. 1998 janv;8(1):105-14.

300. Tanaka M, Hirabayashi Y, Sekiguchi T, Inoue T, Katsuki M, Miyajima A. Targeted disruption of oncostatin M receptor results in altered hematopoiesis. *Blood*. 2003 nov 1;102(9):3154-62.
301. Malik N, Haugen HS, Modrell B, Shoyab M, Clegg CH. Developmental abnormalities in mice transgenic for bovine oncostatin M. *Mol. Cell. Biol.* 1995 mai;15(5):2349-58.
302. Blais M-E, Louis I, Perreault C. T-cell development: an extrathymic perspective. *Immunol. Rev.* 2006 févr;209:103-14.
303. Sempowski GD, Hale LP, Sundy JS, Massey JM, Koup RA, Douek DC, et al. Leukemia inhibitory factor, oncostatin M, IL-6, and stem cell factor mRNA expression in human thymus increases with age and is associated with thymic atrophy. *J. Immunol.* 2000 févr 15;164(4):2180-7.
304. Okaya A, Kitanaka J, Kitanaka N, Satake M, Kim Y, Terada K, et al. Oncostatin M inhibits proliferation of rat oval cells, OC15-5, inducing differentiation into hepatocytes. *Am. J. Pathol.* 2005 mars;166(3):709-19.
305. Miyajima A, Kinoshita T, Tanaka M, Kamiya A, Mukoyama Y, Hara T. Role of Oncostatin M in hematopoiesis and liver development. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2000 sept;11(3):177-83.
306. Nakamura K, Nonaka H, Saito H, Tanaka M, Miyajima A. Hepatocyte proliferation and tissue remodeling is impaired after liver injury in oncostatin M receptor knockout mice. *Hepatology*. 2004 mars;39(3):635-44.
307. Morikawa Y, Tamura S, Minehata K, Donovan PJ, Miyajima A, Senba E. Essential function of oncostatin m in nociceptive neurons of dorsal root ganglia. *J. Neurosci.* 2004 févr 25;24(8):1941-7.
308. Weiss TW, Samson AL, Niego B, Daniel PB, Medcalf RL. Oncostatin M is a neuroprotective cytokine that inhibits excitotoxic injury in vitro and in vivo. *FASEB J.* 2006 nov;20(13):2369-71.
309. Sims NA, Walsh NC. GP130 cytokines and bone remodelling in health and disease. *BMB Rep.* 2010 août;43(8):513-23.
310. Erices A, Conget P, Rojas C, Minguell JJ. Gp130 activation by soluble interleukin-6 receptor/interleukin-6 enhances osteoblastic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Exp. Cell Res.* 2002 oct 15;280(1):24-32.
311. Malaval L, Liu F, Vernallis AB, Aubin JE. GP130/OSMR is the only LIF/IL-6 family receptor complex to promote osteoblast differentiation of calvaria progenitors. *Journal of Cellular Physiology.* 2005 mars 4;204(2):585-93.
312. Malaval L, Gupta AK, Liu F, Delmas PD, Aubin JE. LIF, but not IL-6, regulates osteoprogenitor differentiation in rat calvaria cell cultures: modulation by dexamethasone. *J. Bone Miner. Res.* 1998 févr;13(2):175-84.
313. Richards CD, Langdon C, Deschamps P, Pennica D, Shaughnessy SG. Stimulation of osteoclast differentiation in vitro by mouse oncostatin M, leukaemia inhibitory factor,

- cardiotrophin-1 and interleukin 6: synergy with dexamethasone. *Cytokine*. 2000 juin;12(6):613-21.
314. Palmqvist P, Persson E, Conaway HH, Lerner UH. IL-6, leukemia inhibitory factor, and oncostatin M stimulate bone resorption and regulate the expression of receptor activator of NF-kappa B ligand, osteoprotegerin, and receptor activator of NF-kappa B in mouse calvariae. *J. Immunol*. 2002 sept 15;169(6):3353-62.
  315. Duplomb L, Baud'huin M, Charrier C, Berreur M, Trichet V, Blanchard F, et al. Interleukin-6 inhibits receptor activator of nuclear factor kappaB ligand-induced osteoclastogenesis by diverting cells into the macrophage lineage: key role of Serine727 phosphorylation of signal transducer and activator of transcription 3. *Endocrinology*. 2008 juill;149(7):3688-97.
  316. Poli V, Balena R, Fattori E, Markatos A, Yamamoto M, Tanaka H, et al. Interleukin-6 deficient mice are protected from bone loss caused by estrogen depletion. *EMBO J*. 1994 mars 1;13(5):1189-96.
  317. Grey A, Mitnick M-A, Masiukiewicz U, Sun B-H, Rudikoff S, Jilka RL, et al. A Role for Interleukin-6 in Parathyroid Hormone-Induced Bone Resorption in Vivo. *Endocrinology*. 1999 janv 10;140(10):4683-90.
  318. Wong PKK, Quinn JMW, Sims NA, van Nieuwenhuijze A, Campbell IK, Wicks IP. Interleukin-6 modulates production of T lymphocyte-derived cytokines in antigen-induced arthritis and drives inflammation-induced osteoclastogenesis. *Arthritis & Rheumatism*. 2006;54(1):158-68.
  319. Kitamura H, Kawata H, Takahashi F, Higuchi Y, Furuichi T, Ohkawa H. Bone marrow neutrophilia and suppressed bone turnover in human interleukin-6 transgenic mice. A cellular relationship among hematopoietic cells, osteoblasts, and osteoclasts mediated by stromal cells in bone marrow. *Am. J. Pathol*. 1995 déc;147(6):1682-92.
  320. De Benedetti F, Rucci N, Del Fattore A, Peruzzi B, Paro R, Longo M, et al. Impaired skeletal development in interleukin-6-transgenic mice: a model for the impact of chronic inflammation on the growing skeletal system. *Arthritis Rheum*. 2006 nov;54(11):3551-63.
  321. Rozen N, Lewinson D, Bick T, Jacob ZC, Stein H, Soudry M. Fracture repair: modulation of fracture-callus and mechanical properties by sequential application of IL-6 following PTH 1-34 or PTH 28-48. *Bone*. 2007 sept;41(3):437-45.
  322. Yang X, Ricciardi BF, Hernandez-Soria A, Shi Y, Pleshko Camacho N, Bostrom MPG. Callus mineralization and maturation are delayed during fracture healing in interleukin-6 knockout mice. *Bone*. 2007 déc;41(6):928-36.
  323. Bozec A, Bakiri L, Hoebertz A, Eferl R, Schilling AF, Komnenovic V, et al. Osteoclast size is controlled by Fra-2 through LIF/LIF-receptor signalling and hypoxia. *Nature*. 2008 juin 11;454(7201):221-5.
  324. Bellido T, Borba VZ, Roberson P, Manolagas SC. Activation of the Janus kinase/STAT (signal transducer and activator of transcription) signal transduction pathway by

- interleukin-6-type cytokines promotes osteoblast differentiation. *Endocrinology*. 1997 sept;138(9):3666-76.
325. Malaval L, Aubin JE. Biphasic effects of leukemia inhibitory factor on osteoblastic differentiation. *J. Cell. Biochem. Suppl.* 2001;Suppl 36:63-70.
326. Dagoneau N, Scheffer D, Huber C, Al-Gazali LI, Di Rocco M, Godard A, et al. Null Leukemia Inhibitory Factor Receptor (LIFR) Mutations in Stüve-Wiedemann/Schwartz-Jampel Type 2 Syndrome. *The American Journal of Human Genetics*. 2004 févr;74(2):298-305.
327. Ware CB, Horowitz MC, Renshaw BR, Hunt JS, Liggitt D, Koblar SA, et al. Targeted disruption of the low-affinity leukemia inhibitory factor receptor gene causes placental, skeletal, neural and metabolic defects and results in perinatal death. *Development*. 1995 mai;121(5):1283-99.
328. Metcalf D, Gearing DP. Fatal Syndrome in Mice Engrafted with Cells Producing High Levels of the Leukemia Inhibitory Factor. *PNAS*. 1989 janv 8;86(15):5948-52.
329. Escary J-L, Perreau J, Dum[il]nil D, Ezine S, Br[il]let P. Leukaemia inhibitory factor is necessary for maintenance of haematopoietic stem cells and thymocyte stimulation. , Published online: 27 May 1993; | doi:10.1038/363361a0. 1993 mai 27;363(6427):361-4.
330. Poulton IJ, McGregor NE, Pompolo S, Walker EC, Sims NA. Contrasting roles of leukemia inhibitory factor in murine bone development and remodeling involve region-specific changes in vascularization. *J. Bone Miner. Res.* 2012 mars;27(3):586-95.
331. Suda T, Udagawa N, Nakamura I, Miyaura C, Takahashi N. Modulation of osteoclast differentiation by local factors. *Bone*. 1995 août;17(2 Suppl):87S-91S.
332. Allan EH, Hilton DJ, Brown MA, Evely RS, Yumita S, Metcalf D, et al. Osteoblasts display receptors for and responses to leukemia-inhibitory factor. *J. Cell. Physiol.* 1990 oct;145(1):110-9.
333. Gimble JM, Wanker F, Wang C-S, Bass H, Wu X, Kelly K, et al. Regulation of bone marrow stromal cell differentiation by cytokines whose receptors share the gp130 Protein. *Journal of Cellular Biochemistry*. 1994;54(1):122-33.
334. Guihard P, Danger Y, Brounais B, David E, Brion R, Delecric J, et al. Induction of osteogenesis in mesenchymal stem cells by activated monocytes/macrophages depends on oncostatin M signaling. *Stem Cells*. 2012 avr;30(4):762-72.
335. Hutt JA, DeWille JW. Oncostatin M induces growth arrest of mammary epithelium via a CCAAT/enhancer-binding protein delta-dependent pathway. *Mol. Cancer Ther.* 2002 juin;1(8):601-10.
336. Sims NA, Jenkins BJ, Quinn JMW, Nakamura A, Glatt M, Gillespie MT, et al. Glycoprotein 130 regulates bone turnover and bone size by distinct downstream signaling pathways. *J. Clin. Invest.* 2004 févr;113(3):379-89.

337. Moxham JP. Oncostatin-M Enhances Osteoinduction in a Rabbit Critical Calvarial Defect Model. *The Laryngoscope*. 2007;117(10):1790-7.
338. Liu Y, Wang L, Kikui T, Akiyama K, Chen C, Xu X, et al. Mesenchymal stem cell-based tissue regeneration is governed by recipient T lymphocytes via IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ . *Nat. Med*. 2011 déc;17(12):1594-601.
339. Nakashima T, Takayanagi H. Osteoimmunology: crosstalk between the immune and bone systems. *J. Clin. Immunol*. 2009 sept;29(5):555-67.
340. Tso GHW, Law HKW, Tu W, Chan GCF, Lau YL. Phagocytosis of apoptotic cells modulates mesenchymal stem cells osteogenic differentiation to enhance IL-17 and RANKL expression on CD4<sup>+</sup> T cells. *Stem Cells*. 2010 mai;28(5):939-54.
341. Rifas L. T-cell cytokine induction of BMP-2 regulates human mesenchymal stromal cell differentiation and mineralization. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2006;98(4):706-14.
342. Nicolaidou V, Wong MM, Redpath AN, Ersek A, Baban DF, Williams LM, et al. Monocytes Induce STAT3 Activation in Human Mesenchymal Stem Cells to Promote Osteoblast Formation. *PLoS ONE*. 2012;7(7):e39871.
343. Vandooren B, Noordenbos T, Ambarus C, Krausz S, Cantaert T, Yermenko N, et al. Absence of a classically activated macrophage cytokine signature in peripheral spondylarthritis, including psoriatic arthritis. *Arthritis Rheum*. 2009 avr;60(4):966-75.
344. Sherlock JP, Joyce-Shaikh B, Turner SP, Chao C-C, Sathe M, Grein J, et al. IL-23 induces spondyloarthritis by acting on ROR- $\gamma$ t(+) CD3(+)CD4(-)CD8(-) enthesal resident T cells. *Nat. Med*. 2012;18(7):1069-76.
345. Esashi E, Ito H, Ishihara K, Hirano T, Koyasu S, Miyajima A. Development of CD4<sup>+</sup> Macrophages from Intrathymic T Cell Progenitors Is Induced by Thymic Epithelial Cells. *J Immunol*. 2004 janv 10;173(7):4360-7.
346. Vandesompele J, Preter KD, Pattyn F, Poppe B, Roy NV, Paepe AD, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology*. 2002 juin 18;3(7):research0034.
347. Tamura S, Morikawa Y, Miyajima A, Senba E. Expression of oncostatin M in hematopoietic organs. *Dev. Dyn*. 2002 nov;225(3):327-31.
348. Hoermann G, Cerny-Reiterer S, Perné A, Klauser M, Hoetzenecker K, Klein K, et al. Identification of oncostatin M as a STAT5-dependent mediator of bone marrow remodeling in KIT D816V-positive systemic mastocytosis. *Am. J. Pathol*. 2011 mai;178(5):2344-56.
349. Uchida S, Doi Y, Kudo H, Furukawa H, Nakamura T, Fujimoto S. Transient expression of activin betaA mRNA on osteoprogenitor cells in rat bone regeneration after drill-hole injury. *Bone*. 2000 juill;27(1):81-90.
350. Campbell TM, Wong WT, Mackie EJ. Establishment of a model of cortical bone repair in mice. *Calcif. Tissue Int*. 2003 juill;73(1):49-55.

351. Daley JM, Thomay AA, Connolly MD, Reichner JS, Albina JE. Use of Ly6G-specific monoclonal antibody to deplete neutrophils in mice. *J. Leukoc. Biol.* 2008 janv;83(1):64-70.
352. Rega G, Kaun C, Demyanets S, Pfaffenberger S, Rychli K, Hohensinner PJ, et al. Vascular endothelial growth factor is induced by the inflammatory cytokines interleukin-6 and oncostatin m in human adipose tissue in vitro and in murine adipose tissue in vivo. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2007 juill;27(7):1587-95.
353. Chiu YG, Shao T, Feng C, Mensah KA, Thullen M, Schwarz EM, et al. CD16 (FcRgammaIII) as a potential marker of osteoclast precursors in psoriatic arthritis. *Arthritis Res. Ther.* 2010;12(1):R14.
354. Ganesh K, Das A, Dickerson R, Khanna S, Parinandi NL, Gordillo GM, et al. Prostaglandin E2 Induces Oncostatin M Expression in Human Chronic Wound Macrophages through Axl Receptor Tyrosine Kinase Pathway. *J. Immunol.* 2012 sept 1;189(5):2563-73.
355. Goren I, Kämpfer H, Müller E, Schiefelbein D, Pfeilschifter J, Frank S. Oncostatin M Expression Is Functionally Connected to Neutrophils in the Early Inflammatory Phase of Skin Repair: Implications for Normal and Diabetes-Impaired Wounds. *Journal of Investigative Dermatology.* 2006;126(3):628-37.
356. Brounais B, Chipoy C, Mori K, Charrier C, Battaglia S, Pilet P, et al. Oncostatin M induces bone loss and sensitizes rat osteosarcoma to the antitumor effect of Midostaurin in vivo. *Clin. Cancer Res.* 2008 sept 1;14(17):5400-9.
357. Marvie P, Lisbonne M, L'helgoualc'h A, Rauch M, Turlin B, Preisser L, et al. Interleukin-33 overexpression is associated with liver fibrosis in mice and humans. *J. Cell. Mol. Med.* 2010 juin;14(6B):1726-39.
358. Saleh H, Eeles D, Hodge JM, Nicholson GC, Gu R, Pompolo S, et al. Interleukin-33, a target of parathyroid hormone and oncostatin m, increases osteoblastic matrix mineral deposition and inhibits osteoclast formation in vitro. *Endocrinology.* 2011 mai;152(5):1911-22.
359. Fritz DK, Kerr C, Fattouh R, Llop-Guevara A, Khan WI, Jordana M, et al. A Mouse Model of Airway Disease: Oncostatin M-Induced Pulmonary Eosinophilia, Goblet Cell Hyperplasia, and Airway Hyperresponsiveness Are STAT6 Dependent, and Interstitial Pulmonary Fibrosis Is STAT6 Independent. *J Immunol.* 2011 janv 15;186(2):1107-18.
360. Elbjeirami WM, Truong LD, Tawil A, Wang W, Dawson S, Lan HY, et al. Early Differential Expression of Oncostatin M in Obstructive Nephropathy. *Journal of Interferon & Cytokine Research.* 2010 juill;30(7):513-23.
361. Singh R, Lillard JW Jr. Nanoparticle-based targeted drug delivery. *Exp. Mol. Pathol.* 2009 juin;86(3):215-23.
362. Hauschka PV, Mavrakos AE, Iafrazi MD, Doleman SE, Klagsbrun M. Growth factors in bone matrix. Isolation of multiple types by affinity chromatography on heparin-Sepharose. *J. Biol. Chem.* 1986 sept 25;261(27):12665-74.

363. Somasundaram R, Ruehl M, Schaefer B, Schmid M, Ackermann R, Riecken EO, et al. Interstitial collagens I, III, and VI sequester and modulate the multifunctional cytokine oncostatin M. *J. Biol. Chem.* 2002 févr 1;277(5):3242-6.
364. Boone DW. Complications of iliac crest graft and bone grafting alternatives in foot and ankle surgery. *Foot Ankle Clin.* 2003 mars;8(1):1-14.
365. Cordonnier T, Sohier J, Sensebé L, Layrolle P, Rosset P. Healing of long-bone defects in sheep metatarsals using bioceramics and mesenchymal stem cells. *Current Orthopaedic Practice.* 2012 mai;1.

## ROLE DES MONOCYTES / MACROPHAGES DANS LES PROCESSUS D'OSSIFICATION PHYSIOPATHOLOGIQUE

**Mots-clés** : cellules souches mésenchymateuse, macrophages, oncostatine M, remodelage osseux, inflammation

Le remodelage osseux, permis par les ostéoclastes et les ostéoblastes, est régulé par des facteurs ostéoactifs tels que des membres des familles du TNF, des BMPs ou des Wnt. Récemment, le rôle de la lignée monocytes / macrophages dans le contrôle de ce remodelage osseux a été mis en évidence. Cependant, le ou les facteurs de couplage entre macrophages et ostéoblastes n'ont à ce jour pas été décrits.

Dans un premier temps, nous avons identifié l'OSM, une cytokine appartenant à la famille de l'IL-6, comme étant un facteur de couplage majeur produit par les monocytes / macrophages humains circulants activés par le LPS et selon une voie COX2 / PGE2 dépendante. L'OSM stimule alors l'expression de marqueurs ostéoblastiques dans des cellules souches mésenchymateuses (via STAT3), ainsi que leur différenciation en ostéoblastes et la minéralisation de la MEC.

Le rôle présumé de l'OSM dans la (re)formation osseuse a ensuite été confirmé par des modèles de défauts osseux non critiques chez la souris déficiente en OSM. Nous avons observé une surexpression de l'OSM chez les animaux sauvages après création du défaut ainsi qu'un retard de cicatrisation pour les animaux KO. Bien que le défaut entraîne un afflux de macrophages, nous n'avons pas encore pu mettre en évidence de production d'OSM par ces macrophages, cette deuxième étude nécessite donc des analyses complémentaires.

A terme, ces études permettraient d'améliorer la compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans la cicatrisation osseuse et pourraient permettre le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques pour le traitement des patients souffrant de traumatismes osseux ne pouvant se consolider sans aide pharmacologique ou chirurgicale.

## ROLE OF MONOCYTES / MACROPHAGES IN PHYSIOPATHOLOGICAL OSSIFICATION PROCESSES

**Keywords** : Mesenchymal stem cells, macrophages, oncostatin M, bone remodeling

Bone remodeling controlled by osteoclasts and osteoblasts is regulated by osteoactive factors such as TNF, BMPs or Wnt family members. Recently, cells of the monocytes / macrophages lineage have been also implicated in this process. However, coupling factor(s) between osteoblasts and macrophages have not been identified yet.

We first identified OSM, an IL-6 type cytokine, as a major coupling factor produced by LPS activated circulating macrophages in a COX2 / PGE2 dependant manner. OSM induces osteoblastic markers overexpression in mesenchymal stem cells (via STAT3), osteoblasts differentiation and extracellular matrix mineralization.

Secondly, OSM implication in bone (re)formation as been confirmed in non critical bone defects models in OSM knockout mice. We showed that bone defect leads to OSM overexpression in wild-type mice and induces a delay in bone wound healing in knockout mice. Even if bone defect induce an increase in macrophages number, we have not yet been able to demonstrate OSM production by these macrophages. This second study therefore requires additional analyzes.

Ultimately, these studies would enhance understanding of the molecular mechanisms involved in bone healing. This could enable the development of new therapeutic strategies for the treatment of patients suffering from bone injuries that cannot be consolidated without using pharmacological or surgical treatments.