

**THÈSE**

pour l'obtention du diplôme de

**DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ BORDEAUX 2**

**Mention : Sciences, Technologie, Santé**

**Option : Biologie Cellulaire et Physiopathologie**

**Présentée et soutenue publiquement**

*Le 27 octobre 2009*

*Par Laurent-Emmanuel MONFOULET*

*Né le 30 octobre 1982 à Bordeaux*

**Rôle de deux protéines de la matrice extracellulaire osseuse,  
l'ostéopontine (OPN) et la sialoprotéine osseuse (BSP), dans la  
réparation osseuse par génétique expérimentale chez la souris**

**Membres du Jury**

Pr Marie-Hélène LAFAGE-PROUST, Saint-Etienne ..... Présidente  
Dr Nathalie ROCHET, Nice ..... Rapporteur  
Pr Pierre GILLET, Nancy ..... Rapporteur  
Pr Elisabeth ENGEL, Barcelone ..... Examineur  
Dr Pierre MARIE, Paris ..... Examineur  
Dr Olivier CHASSANDE, Bordeaux ..... Directeur de thèse



Cette thèse a été réalisée au sein de :

Unité de recherche mixte :  
Université Victor Segalen Bordeaux 2 / INSERM U577  
"Biomatériaux et Réparation Tissulaire"

Université Victor Segalen Bordeaux 2  
Zone Nord, Bât 4A - case postale 45  
146, rue Léo-Saignat  
33076 Bordeaux cedex France  
tél. : 05 57 57 14 88 / fax : 05 56 90 05 17

<http://www.u577.u-bordeaux2.fr/>

Sous la direction de :  
Olivier Chassande (CR1 CNRS / HDR)



« ... c'était le langage de l'enthousiasme, des choses que l'on fait avec amour, avec passion, en vue d'un résultat que l'on souhaite obtenir ou en quoi l'on croit. »

Paolo Coelho, *L'alchimiste*.



# REMERCIEMENTS

---

Je tiens tout d'abord à adresser mes remerciements au Dr Joelle Amédée et au Pr Laurence Bordenave de m'avoir accueilli au sein de l'unité U577 au cours de ces trois années de thèse et de mon DEA.

Mes plus vifs remerciements sont évidemment destinés à Olivier Chassande qui m'a encadré tout au long de ces quatre années. Je te remercie pour la confiance que tu m'as accordée et pour tout l'enrichissement scientifique que j'ai pu trouver en travaillant à tes côtés.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude aux membres de mon jury de thèse. Merci Marie-Hélène d'avoir acceptée la présidence de ce jury. Je remercie fortement le Dr Nathalie Rochet et le Pr Pierre Gillet d'avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail. Merci au Pr Elisabeth Engelet et au Dr Pierre Marie, examinateurs de mon manuscrit. Merci à tous.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance à Luc Malaval et à Jane E. Aubin pour leurs conseils notamment pour la préparation des manuscrits.

Merci à l'ensemble du laboratoire U577 pour ces quatre années. Merci à Sophie, Véronique, Patrick, Betty (Vive le médoc !), Richard, Christel, Noélie, Reine (profite bien de notre belle région et de ses plages qui nous sont si chères !), Christine, Murielle, Marie-Christine, Jean-Christophe, Philippe et tous ceux que je n'ai pas cités.

Un merci tout particulier à Chantal qui m'a supporté dans son bureau pendant ces trois années de thèse. Merci pour ton soutien, ton aide (surtout pour la bio mol et la bactério), et bien sur pour les nombreux bons moments. Je n'oublie bien évidemment pas mes trois camarades : Omar, Charlotte, et Céline. Charlotte et Omar, désolé de vous quitter aussi rapidement, je vous laisse sous la surveillance de Céline. Bonne continuation pour vos thèses, et pas de bêtises ;-). Céline, j'ai été très heureux de partager mes trois années de thèse avec toi. Merci pour ta présence et ton amitié.

Je tiens également à remercier chaleureusement Martine Renard et Samantha Delmond du CIC-IT pour tous leurs conseils, nos nombreux échanges scientifiques, leur amitié et pour les nombreux repas habilement orchestrés par Sam.

Pour finir, je voudrais remercier ma famille. Merci à ma grand-mère pour toute son attention. De grosses bises pour la meilleure des Taties ; merci pour notre complicité. Enfin merci à mes parents qui m'ont encouragé dans cette voie jusqu'à la soutenance de ce doctorat. Je ne sais comment vous remercier si ce n'est en vous dédiant cette thèse.

Merci enfin à mon petit ange qui est là pour moi, à tout moment, depuis deux ans et pour de nombreuses années encore.

## RESUME

---

Un os long est composé de tissus osseux cortical et spongieux. Ces tissus ont des structures et des caractéristiques physiques différentes mais ont tous deux la capacité de se régénérer de façon naturelle suite à une lésion. Cette régénération ou réparation implique une séquence bien caractérisée d'événements contrôlés par l'interaction étroite entre des facteurs de croissance, des cellules, l'environnement chimique et dynamique, ainsi que par la matrice extracellulaire. L'ostéopontine (OPN) et la sialoprotéine osseuse (BSP) sont des protéines de la matrice extracellulaire exerçant des fonctions importantes dans le tissu osseux.

Le but de ce travail a été d'étudier le rôle de l'OPN et de la BSP dans la réparation osseuse par génétique expérimentale.

Les modèles utilisés dans cette études consistent en des lésions, l'un diaphysaire et purement cortical, l'autre région épi-métaphysaire mêlant destruction de l'os cortical, trabéculaire et de la plaque de croissance. La réparation de ces lésions a été analysée par microtomographie haute résolution aux rayons X et par histomorphométrie.

Dans un premier temps, la réparation d'une perforation épi-métaphysaire dans le fémur chez la souris, a été caractérisée et comparée à celle de même diamètre réalisée dans la diaphyse. Dans cette étude comparative, des profils distincts de réparation ont été mis en évidence bien que tous deux mettent en place un mécanisme d'ossification intramembranaire. Ainsi, le défaut cortical diaphysaire est comblé par une formation osseuse centripète restreinte à la zone corticale. Dans le modèle épi-métaphysaire, la formation osseuse est initiée au fond du défaut et se propager vers le cortex. Ce processus aboutit à une restauration des travées mais à une réparation incomplète du cortex. Ainsi, le premier modèle apparaît comme pertinent pour l'étude de la réparation corticale alors que le modèle épi-métaphysaire se présente plus adapté à l'étude de la réparation de l'os trabéculaire.

L'OPN et la BSP n'ont pas de fonctions redondantes dans la réparation de ces lésions. En effet, l'OPN intervient principalement dans la réparation de l'os trabéculaire, son absence entraîne un retard lié à un défaut de progression de l'os au sein de la cavité. L'absence de BSP quant à elle, semble intervenir uniquement dans le processus de réparation de l'os cortical diaphysaire, provoquant un retard de réparation dû à un défaut de minéralisation de l'ostéoïde.

Les travaux réalisés au cours de cette thèse ont permis de caractériser des modèles de lésions osseuses pertinents pour l'étude de la réparation de l'os cortical et spongieux. L'utilisation de ces modèles a permis d'améliorer la compréhension du rôle de deux protéines de la matrice extracellulaire osseuse dans la réparation de cortical et trabéculaire grâce aux modèles de génétique expérimentale.

### Mots clés :

---

OPN, BSP, défaut, réparation osseuse, os cartical, os trabéculaire, minéralisation, tomographie, histomorphométrie.

## SUMMARY

---

Long bones consist of cortical and spongy bone tissue, which have different structures and physiological characteristics. Both can heal spontaneously. Bone healing is a complex multi-step process which depends on cells, soluble factors, mechanical environment and bone matrix. Osteopontin (OPN) and Bone Sialoprotein (BSP) are extracellular matrix proteins, which have been shown to exert important functions in bone.

The aim of this study is to address the role of OPN and BSP in bone repair using experimental genetic strategies.

Injured bone models are drilled-hole defects performed in diaphyseal cortical bone or in the epi-metaphyseal region. Bone healing was analyzed by micro-tomography and histomorphometry.

Epi-metaphyseal defect healing was characterized and compared to cortical bone repair. In this comparative study, distinct patterns of bone repair have been shown while in both models repair occurs through intramembranous ossification. Diaphyseal defect was rapidly filled with newly bone formed in a centripetal manner within the cortical gap. In contrast, bone formation within the epi-metaphyseal defect was initiated from the depth of the cavity and spread towards the cortical edges, regenerating cancellous bone and albeit not completely cortical wall. Therefore, diaphyseal drill defects appear pertinent for the study of spontaneous cortical healing whereas epi-metaphyseal drill defects appear as appropriate models to investigate spongy bone regeneration.

OPN and BSP do not show redundancy in the bone repair process of these two models. Indeed, OPN is mainly involved in trabecular bone repair; its deficiency induced a delay due to impaired bone progression within the epi-metaphyseal cavity. The lack of BSP only delayed cortical bone repair due to an impaired mineralization of the bone matrix.

This study permits to characterize pertinent models of cortical and trabecular bone repair. Application of these models added new insights on the involvement of matrix proteins in cortical defect healing and trabecular bone repair using experimental genetic models.

### Key words:

---

OPN, BSP, bone repair, cortical defect, trabecular bone, mineralization,  $\mu$ CT, histomorphometry.



# Table des matières

---

<b>Table des matières</b> .....	1
<b>Abréviations</b> .....	4
<b>Liste des figures</b> .....	5
<b>Liste des tableaux</b> .....	7
<b>Introduction</b> .....	9
<b>Revue Bibliographique</b> .....	12
I. Le tissu osseux .....	13
1. Fonction du tissu osseux .....	13
2. Structure du tissu osseux .....	13
2.1. Les structures osseuses élémentaires .....	15
2.2. L'os cortical ou compact .....	16
2.3. L'os trabéculaire ou spongieux .....	16
2.4. La vascularisation du tissu osseux .....	17
3. Les éléments cellulaires .....	18
3.1. Les cellules ostéoblastiques .....	18
3.1.1. Les ostéoblastes .....	18
3.1.2. Les ostéocytes .....	19
3.1.3. Les cellules bordantes .....	19
3.2. Les ostéoclastes .....	19
4. La matrice extracellulaire du tissu osseux .....	20
4.1. Composition de la matrice osseuse .....	20
4.1.1. La phase organique .....	20
4.1.1.1. Le collagène de type 1 $\alpha$ .....	20
4.1.1.2. Les protéines non collagéniques .....	21
<i>Les Gla protéines :</i> .....	22
<i>Les glycoprotéines (non SIBLINGs)</i> .....	22
<i>Les SIBLINGs</i> .....	23
<i>Les protéoglycanes</i> .....	23
<i>Les facteurs de croissance et protéines sériques</i> .....	23
4.1.2. La phase minérale .....	24
4.2. La biominéralisation de la matrice .....	24
4.2.1. La biominéralisation .....	24
- La minéralisation de la matrice par vésicules matricielles (Figure 11 et Figure 12) .....	24

- Les cristaux fantômes .....	26
- Les calcosphérulites .....	26
- Les <i>Biom mineralization foci (BMF)</i> .....	26
- Les fibrilles de collagène .....	27
4.2.2. Les modulateurs de la minéralisation .....	27
5. Origine et formation du tissu osseux .....	28
5.1. Ossification intramembranaire .....	29
5.2. Ossification endochondrale .....	30
5.3. Régulation de l'ossification intramembranaire et endochondrale .....	31
6. Physiologie osseuse .....	33
6.1. Le modelage et remodelage du tissu osseux .....	33
6.1.1. Le modelage osseux .....	33
6.1.2. Le remodelage osseux .....	33
6.2. Le tissu osseux et son rôle dans l'homéostasie .....	36
6.2.1. L'homéostasie calcique .....	37
6.2.2. L'homéostasie du phosphate .....	37
6.3. Les modulateurs du tissu osseux .....	38
6.3.1. Les facteurs locaux .....	38
6.3.2. Les facteurs systémiques .....	39
6.3.3. Les forces mécaniques .....	41
II. La réparation naturelle du tissu osseux .....	42
1. Mécanisme général de la réparation osseuse .....	42
1.1. Les différents types de lésions osseuses et modes de réparation .....	42
1.2. Les phases de la réparation osseuse (Tableau 5) .....	44
1.3. Réparation et embryogenèse .....	46
2. Les cellules ostéoprogénitrices .....	46
- Les cellules bordantes endostéales et les ostéoprogéniteurs du système vasculaire haversien .....	48
- Les cellules mésenchymateuses de la moelle osseuse .....	48
- Les cellules des tissus mous environnants .....	49
3. Les forces mécaniques et leur rôle dans le contrôle de la réparation osseuse .....	49
4. Les fractures osseuses .....	51
5. Les défauts, perforations ou « défaut » osseux .....	53
5.1.1. Le modèle calvaria .....	54
5.1.2. Le modèle de défaut cortical diaphysaire .....	54
5.1.3. Les défauts épi-métaphysaires .....	56
6. Les modulateurs de la réparation .....	57
6.1. Les facteurs solubles .....	57
6.1.1. les cytokines inflammatoires .....	57
6.1.2. Les facteurs de croissance .....	57
6.2. Les protéines de la matrice extracellulaire dans la réparation osseuse .....	58
<b>Objectifs .....</b>	<b>60</b>

<b>Résultats .....</b>	<b>63</b>
1. Développement et caractérisation de la réparation de modèles de lésions osseuses de type « défaut » chez la souris.....	64
1.1. Introduction .....	64
1.2. Article 1 : Caractérisation de la réparation dans les modèles de défaut diaphysaire et métaphysaire.....	68
1.3. Resultats complementaires. ....	85
1.4. Conclusion.....	86
2. Les protéines de la matrice extracellulaire dans la réparation de défauts osseux.....	87
2.1 Introduction .....	87
2.1.1. La famille des SIBLINGs .....	87
2.1.2 L'ostéopontine .....	89
2.1.3. La BSP.....	92
2.2 Article 2 : Rôle de l'OPN et de la BSP dans la réparation d'un défaut cortical diaphysaire chez la souris .....	95
2.3 Article 3 : Rôle de l'OPN et de la BSP dans la réparation d'un défaut épi-métaphysaire chez la souris. ....	113
<b>Conclusions et perspectives.....</b>	<b>131</b>
<b>Annexes.....</b>	<b>136</b>
<b>Communications Scientifiques.....</b>	<b>146</b>
<b>Bibliographie.....</b>	<b>149</b>

## Abréviations

---

ATP /.AMP : Adénosine Tri/Mono Phosphate  
bFGF : basic FGF  
BMF : Bio Mineralized Foci  
BMP : Bone Morphogenetic Protein  
BMU : Bone Multicellular Unit  
BSP : Bone SialoProtein  
BRU : Bone Remodeling Unit  
BVF : Bone Volume Fraction  
BV/TV : Bone Volume / Tissue Volume  
CSF : Colony Stimulating Factor  
CTR : Calcitonin Receptor  
DMP-1 : Dentin Matrix Protein  
ERR : Estrogen Related Receptor  
FGF : Fibroblast Growth Factor  
FGFR : Fibroblast Growth Factor Receptor (Récepteur au FGF)  
HA / HAP: Hydroxyapatite  
HES : Hématoxyline-Eosine-Safran  
IGF : Insulin-like Growth Factor  
IL : Interleukine  
MGP : Matrix Gla Protein  
MMP : Matrix Metallo Proteinase  
OCN : Ostéocalcine  
Oc.S./BS: Osteoclast surface / Bone Surface  
OPN : Ostéopontine  
Os.S./BS : Osteoid Surface/Bone Surface  
PAL : Phosphatase Alcaline  
PTH : Parathyroïd Hormone  
RGD : Asparagine-Glycine-Aspartate  
ROI : Region of interest  
SCPP : Secretory calcium binding protein  
SIBLING : Small Integrin Binding N Linked Glycoprotein  
Tb.N. : Trabecular Number  
Tb.Th. : Trabecular thickness  
Tb.Sp. : Trabecular Space  
TGF : Transforming Growth Factor  
TMD : Tissue Mineral Density  
TRAP : Tartrate Resistance Acid Phosphatase  
TR : Thyroïd Receptor  
VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor  
 $\mu$ CT : Micro-Computed-Tomography

## Liste des figures

---

Figure 1 : Différents niveaux de structure du tissu osseux. ....	13
Figure 2 : Structures des différents types d'os du squelette des vertébrés. ....	14
Figure 3 : Exemple d'os lamellaire et fibreux dans un processus de réparation d'une lésion de l'os cortical chez la souris. ....	15
Figure 4 : Microstructure du tissu osseux. ....	16
Figure 5 : Système vasculaire et veineux du tissu osseux. ....	17
Figure 6 : Cellules souches de la moelle osseuse. ....	18
Figure 7 : Etapes de la différenciation des ostéoclastes. ....	20
Figure 8 : Organisation hiérarchique des fibres de collagène de la matrice extracellulaire. ....	21
Figure 9 : Rôle de la phosphatase alcaline (PAL) dans la minéralisation. ....	22
Figure 10 : Fonctions des protéines non collagéniques (PNC) de la matrice extracellulaire du tissu osseux. ....	23
Figure 11 : Minéralisation de la matrice osseuse par les vésicules matricielles. ....	25
Figure 12 : Contrôle de la nucléation et de la propagation du minéral osseux par différents systèmes d'organelles dérivant des cellules osseuses. ....	26
Figure 13 : Origines embryonnaires des os du squelette dans un embryon de stade précoce. ....	28
Figure 14 : Mécanisme d'ossification primaire (ossification intramembranaire). ....	29
Figure 15 : Premiers stades de l'ossification endochondrale. ....	30
Figure 16 : Formation d'un os long par ossification endochondrale. ....	31
Figure 17 : Rôle de la voie canonique Wnt/ $\beta$ -caténine dans la balance entre ossification endochondrale / intramembranaire. ....	32
Figure 18 : Balance entre formation et résorption osseuses. ....	33
Figure 19 : Le cycle du remodelage osseux. ....	34
Figure 20 : Bone Remodeling Unit (BRU) et mise en place d'un vaisseau sanguin. ....	35
Figure 21 : Contrôle de l'homéostasie calcique par la PTH et la calcitonine. ....	37
Figure 22 : Régulation de l'homéostasie du phosphate. ....	38
Figure 23 : Forces mécaniques dans l'environnement cellulaire et systèmes mécanosenseurs des ostéoblastes. ....	41
Figure 24 : Réparation osseuse primaire versus secondaire. ....	42
Figure 25 : Régulation des micro-fractures (micro dommage). ....	43
Figure 26 : Le périoste. ....	47
Figure 27 : Niche cellulaire de la moelle osseuse. ....	48
Figure 28 : Modèle de corrélation entre les forces mécaniques mesurées et le type de tissu au cours de la réparation d'une fracture osseuse. ....	50
Figure 29 : Hypothèse sur l'interaction entre forces de cisaillement et d'étirement dans le contrôle de la différenciation du tissu osseux au cours de la réparation. ....	50
Figure 30 : Cinétique de réparation d'une fracture non stabilisée du tibia chez la souris. ....	51
Figure 31 : Les réponses anaboliques et cataboliques au cours de la réparation osseuse. ....	52
Figure 32 : Cinétique de réparation d'une fracture stabilisée du tibia chez la souris. ....	53
Figure 33 : Défect de taille critique réalisé dans une calvaria de souris. ....	54
Figure 34 : Réparation d'un défect cortical au niveau du tibia. ....	55
Figure 35 : Défect épi-métaphysaire fémoral murin de 1,6 mm de diamètre. ....	56
Figure 36 : Réparation d'un défect cortico-trabéculaire de l'os métaphysaire. ....	56
Figure 37 : Schéma récapitulatif des objectifs de la thèse. ....	62
Figure 38 : Modèle de défect diaphysaire. ....	64
Figure 39 : $\mu$ CT analysis of a diaphyseal defect in mouse. ....	65

Figure 40 : Histological analysis of a diaphysis defect at 7 (A, B, C), 14 (D, E, F), 21 (G) and 28 (H) days after surgery. ....	66
Figure 41 : Quantitative analysis of Bone Volume Fraction (BVF) during defect healing.....	85
Figure 42 : Synténie chromosomique du cortège de gènes d'intérêt osseux observée chez les primates (homme), les rongeurs (rat, souris) et les artiodactylés (vache, chèvre, porc). ....	87
Figure 43 : Evolution des <i>Secretory Calcium binding PhosphoProtein</i> (SCPP) à partir d'une protéine ancestrale SPARC/Ostéonectine.....	88
Figure 44 : Similarité des exons et des introns des gènes des SIBLINGs.....	88
Figure 45 : Structure de l'ostéopontine. ....	90
Figure 46 : Récapitulatif des fonctions de l'OPN. ....	92
Figure 47 : Structure secondaire de la BSP. ....	93
Figure 48 : Récapitulatif des fonctions de la BSP.....	93
Figure 49 : Récapitulatif des phénotypes observés chez les souris déficientes en OPN et en BSP au cours de la réparation de l'os cortical diaphysaire et de l'os trabéculaire épimétaphysaire. ....	130
Figure 50 : Hypothèse quant à l'origine des ostéoprogéniteurs impliqués dans la réparation. ....	133

## Liste des tableaux

---

Tableau 1 : Protéines non collagéniques de la matrice osseuse et leur pourcentage respectif par rapport au total des protéines non collagéniques.....	22
Tableau 2 : Composition de la phase minérale de la matrice osseuse.....	24
Tableau 3 : Régulateurs de la minéralisation osseuse. ....	27
Tableau 4 : Distribution des ions Calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ), Phosphate ( $\text{PO}_4^{3-}$ ), Magnésium ( $\text{Mg}^{2+}$ ) en pourcentage respectif du contenu total de chaque ion dans l'organisme. ....	36
Tableau 5: Cinétique des événements cellulaires et expression des molécules de signalisation durant la réparation osseuse chez la souris. ....	44



# **Introduction**

---

Les travaux effectués au cours de cette thèse ont été réalisés dans l'unité mixte U577, Biomatériaux et Réparation Tissulaire, INSERM, Université Victor Segalen Bordeaux 2, dont l'objectif scientifique fondamental est de contribuer au développement de nouvelles stratégies thérapeutiques utilisables pour la réparation ou le remplacement des organes ou d'un tissu, principalement l'os et les vaisseaux, en complément ou en substitution des phénomènes de réparation naturelle ou de la greffe de tissus ou d'organes.

Le tissu osseux est un tissu conjonctif dynamique caractérisé par sa matrice minéralisée. Tout au long de la vie, l'os est soumis aux activités de formation et de résorption osseuse assurant son renouvellement et son remaniement. Il est capable en cas de lésions, telles que les micro-fractures, les fractures, etc., de se réparer spontanément de façon à rétablir son intégrité et ses propriétés physiques. Cette réparation est dite naturelle. Dans certains cas, quand les pertes osseuses sont trop importantes, la régénération du tissu est compromise et se fait de façon incomplète. Il est alors nécessaire de faire appel à des stratégies visant à aider la reconstruction osseuse. Celles-ci consistent en première intention en des greffes. Le terme d'autogreffe est utilisé lorsque l'organe greffé provient du même individu, l'allogreffe correspond à un greffon provenant d'un individu de la même espèce et la xéno greffe à celui provenant d'un individu d'une espèce différente. La disponibilité réduite des autogreffes et les risques potentiels d'ordre infectieux et immunologiques des allogreffes conduisent à la recherche d'alternatives à ces greffes osseuses. Le recours à l'implantation de biomatériaux efficaces et assurant une parfaite biosécurité pour le patient apparaît donc être une solution alternative. La régénération n'est alors plus naturelle mais guidée par un biomatériau.

Les principaux matériaux de substitution et/ou de comblement osseux actuellement utilisés (alliages métalliques, polymères, céramiques de phosphate de calcium, composites ou non) ont, à des degrés divers, une performance insuffisante due à une adaptation incomplète aux contraintes de l'environnement des tissus vivants au sein desquels ils sont intégrés. En outre, les échecs rencontrés dans le domaine de la substitution osseuse guidée par les biomatériaux sont liés à leur faible capacité de colonisation mais surtout à un défaut de vascularisation après leur implantation. Ainsi, face aux problèmes rencontrés par ces différents types de matériaux, les techniques d'ingénierie tissulaire permettent à ce jour de développer de nouvelles stratégies de médecine régénératrice pour le remplacement d'un organe. L'ingénierie tissulaire se définit comme l'application des principes d'ingénierie et des sciences de la vie afin de développer des substituts biologiques qui vont restaurer, maintenir ou améliorer la fonction des tissus. Ce champ interdisciplinaire combine les savoirs et les procédés venant de la physique, la biologie cellulaire, l'ingénierie chimique et les sciences de la matière. Ces disciplines proposent l'association d'une composante matricielle (le biomatériau) à une composante biologique afin de restaurer, d'améliorer ou de remplacer un organe défaillant ou un tissu lésé.

La réparation, quelle soit naturelle ou guidée par un biomatériau, est la résultante de l'action combinée de quatre composantes principales : les cellules, les facteurs solubles locaux, les forces mécaniques et la matrice. Cette dernière est au centre de la réparation tissulaire. Elle constitue le support physique d'un biomatériau et assure la structure du tissu formé au cours de la réparation. Sa composition détermine les propriétés mécaniques du tissu, elle intervient dans la séquestration et la diffusion de facteurs. Cette matrice sert également de support aux cellules pour leur adhésion, leur migration ainsi que pour leur différenciation et leur maturation.

Afin d'étudier le rôle de la matrice ou des autres composantes (cellulaires, mécaniques et biochimiques), dans la réparation naturelle ou guidée par un biomatériau, il est nécessaire de disposer de modèles d'étude pertinents.

La première partie des travaux présentés dans cette thèse a consisté en la caractérisation de modèles de lésions osseuses chez la souris pouvant servir à l'étude de la réparation osseuse naturelle ou guidée par un biomatériau. Ces modèles ont permis de caractériser et de comparer les profils de la réparation naturelle de l'os cortical et de l'os trabéculaire.

Ces travaux ont été utilisés, dans la seconde partie de l'étude, pour étudier le rôle de deux protéines de la matrice extracellulaire du tissu osseux, l'ostéopontine (OPN) et la sialoprotéine osseuse (BSP) dans la réparation osseuse naturelle. Cette seconde étude a été réalisée par génétique expérimentale c'est-à-dire par utilisation de souris déficientes pour ces protéines. Ainsi, la réalisation de lésions osseuses chez les souris déficientes en OPN et des souris déficientes en BSP ont permis de mettre en évidence le rôle respectif de ces deux protéines dans la réparation naturelle de l'os cortical et de l'os trabéculaire.

## **Revue Bibliographique**

---

La première partie de cette revue bibliographique présente le tissu osseux en détaillant sa fonction, sa structure, les éléments cellulaires qui le composent, sa matrice extracellulaire et notamment le mécanisme de biominéralisation, sa formation et son remodelage.

Le tissu osseux a la capacité, suite à une lésion, de se régénérer. La réparation osseuse fait l'objet de la seconde partie de cette revue bibliographique. Ce chapitre met en avant les mécanismes de la réparation en fonction des types de lésion osseuse. Il insiste également sur les acteurs de la réparation osseuse que sont les cellules, les facteurs locaux, le microenvironnement mécanique et la matrice.

## I. Le tissu osseux

### 1. Fonction du tissu osseux

Pour le commun des mortels, l'os constitue le squelette des vertébrés. Pour les biologistes, c'est en plus un tissu conjonctif hautement spécialisé caractérisé par une matrice extracellulaire minéralisée dite calcifiée. Cette composition confère au tissu osseux dureté et rigidité. Ces caractéristiques attribuent à l'os de nombreuses fonctions dans l'organisme tant au niveau biomécanique que métabolique.

Premièrement, il constitue le squelette et permet ainsi le soutien de l'organisme. Associé au tissu musculaire, il permet la posture, les mouvements et la locomotion.

Deuxièmement, il assure la protection d'organes impliqués dans des fonctions vitales : le système nerveux central est protégé par la boîte crânienne et les vertèbres ; le cœur et les poumons par la cage thoracique ; enfin le tissu hématopoïétique est protégé de par sa localisation, au centre des os (os longs principalement).

Le tissu osseux est un acteur important dans l'homéostasie phosphocalcique. En effet, il renferme environ 99% du calcium et près de 90% du phosphore de l'organisme. Il contribue fortement à la régulation de la composition minérale des fluides extracellulaires [Parfitt 1987; Doyle et al. 2008].

### 2. Structure du tissu osseux

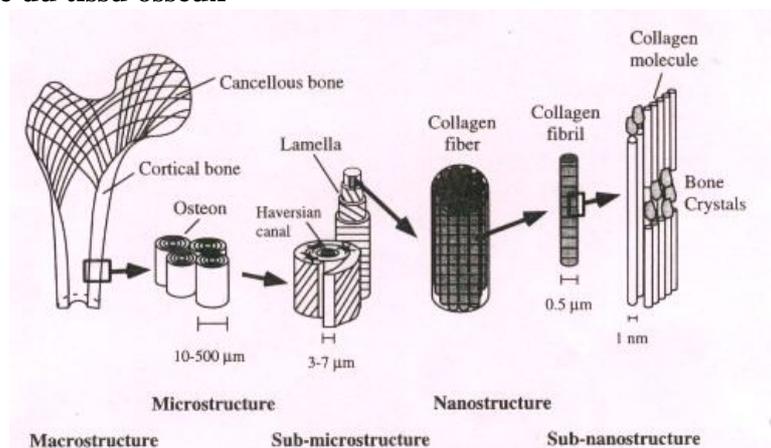
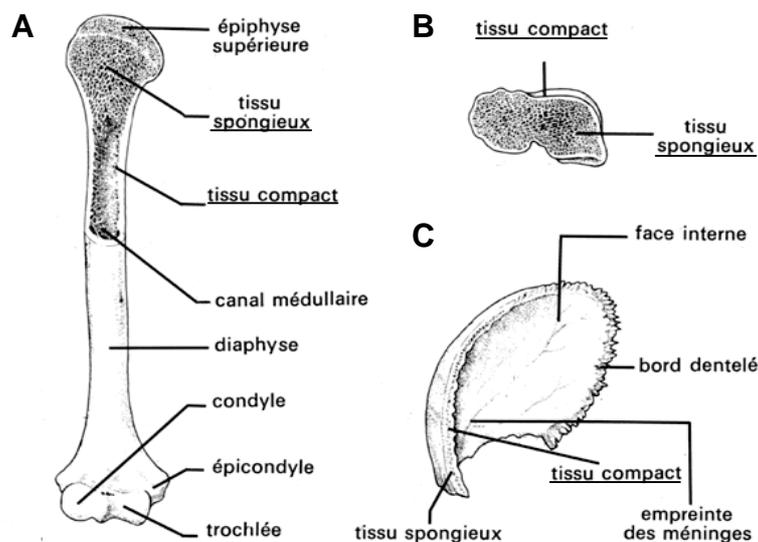


Figure 1 : Différents niveaux de structure du tissu osseux.

Le tissu osseux est composé d'éléments cellulaires, assurant son modelage et remodelage grâce à une balance entre synthèse et dégradation, et d'une matrice organique

(produite par les cellules) qui, à l'échelle nanométrique, se compose majoritairement de fibres de collagène au niveau desquelles se déposent une phase inorganique. Ces fibres s'organisent de façon parallèle pour former un os dit lamellaire. Chez l'homme, l'os lamellaire s'organise de manière concentrique, autour d'un canal central, en microstructure nommée ostéon. La juxtaposition d'ostéon permet de former l'os cortical et trabéculaire (Figure 1).

D'un point de vue macroscopique, nous distinguons dans le squelette des vertébrés, les os longs (fémur, tibia, ulna ou cubitus, fibula ou péroné), les os courts (vertèbres, carpes, tarses) et les os dits plats (os du crâne et de la face, le sternum, la scapula ou omoplate).



**Figure 2 : Structures des différents types d'os du squelette des vertébrés.**

(A) os long ; (B) os court ; (C) os plat

<http://www-rocq.inria.fr/who/Marc.Thiriet/Glosr/Bio/Locomot/Fig/Os/OsStruct.gif>

Les os dits longs ont une organisation propre. Ils sont composés à leurs extrémités d'une épiphyse, d'une partie centrale appelée la diaphyse, et d'une métaphyse réalisant la jonction entre ces deux parties.

En coupe longitudinale, la diaphyse est constituée d'une cavité occupée par la moelle osseuse (tissu hématopoïétique). Cette cavité est tapissée d'une couche cellulaire, l'endoste. Chez l'homme, au niveau de la diaphyse un accroissement du diamètre osseux est observé au cours de la vie. Au niveau des métaphyses, se trouve la plaque de croissance, responsable de la croissance de l'os en longueur (Figure 2A).

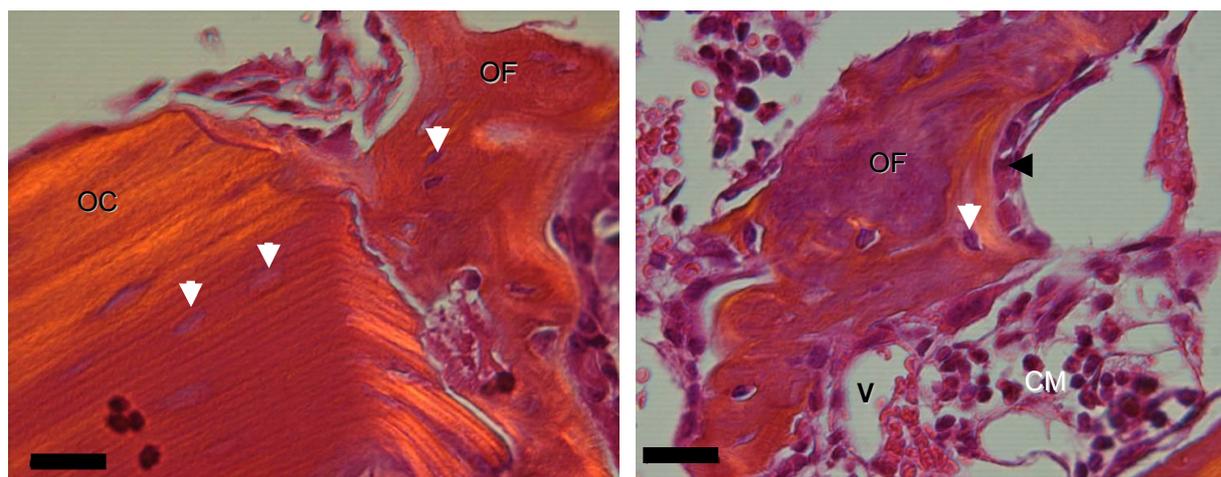
Chez l'adulte, deux structures de base sont observées dans l'architecture du tissu quel que soit le type d'os, long, court ou plat : l'os cortical ou compact et l'os trabéculaire ou spongieux (Figure 2). Du point de vue de la nanostructure, l'organisation des fibres de collagènes de la matrice extracellulaire et du minéral osseux déterminent des structures élémentaires d'os : l'os fibreux ou tissé et l'os lamellaire.

## 2.1. Les structures osseuses élémentaires

Trois structures élémentaires constituent les os du squelette au cours de la vie. L'os fibreux et l'os en faisceau (*bundle bone*) sont des structures temporaires rapidement remplacées au cours du remodelage osseux par de l'os lamellaire [Pritchard 1972].

Le *bundle bone* possède une matrice dominée par un arrangement régulier de gros paquets de fibres de collagène intercalés d'ostéocytes. Il se développe selon une séquence temporelle puis spatiale ordonnée, au détriment des tendons ou ligaments, dont les cellules se différencient en ostéoblastes puis en ostéocytes au fur et à mesure que les paquets de fibres se calcifient. Ce type d'os persiste au point d'attachement des tendons et ligaments, ainsi qu'au niveau des sutures des os plats du crâne.

L'os fibreux ou tissé est caractéristique de l'os embryonnaire, des étapes précoces de la réparation osseuse et de certaines conditions pathologiques. C'est un os composé d'une matrice rapidement déposée, constituée de fibres de collagène entrecroisées et sans organisation et dont la matrice est ostensiblement plus calcifiée que dans les deux autres structures élémentaires, et renferme quelques larges ostéocytes. Ce type d'os est rapidement remplacé par de l'os lamellaire (Figure 3).



**Figure 3 : Exemple d'os lamellaire et fibreux dans un processus de réparation d'une lésion de l'os cortical chez la souris.**

Coloration Hémalum-Eosine-Safran. Observation en lumière polarisée. Os cortical lamellaire (OC) et os fibreux (OF), ostéocytes (flèche blanche), ostéoblastes (tête de flèche noire), vaisseau sanguin (V), cellules mésenchymateuses (CM). La barre représente 10 µm. (Données personnelles)

L'os lamellaire tire son nom de l'organisation régulière, parallèle, des fibres de la matrice osseuse (Figure 3). Son degré de minéralisation est plus faible mais son organisation générale lui confère des propriétés mécaniques supérieures à celles de l'os fibreux.

Chez l'homme, l'os cortical est formé d'un mélange d'os fibreux, peu dense, et d'os lamellaire de densité élevée.

## 2.2. L'os cortical ou compact

L'os cortical ou os compact (Figure 4, 1) est un os dense, poreux et constitué de matrice minéralisée de type lamellaire. Il est organisé en structures cylindriques appelées ostéons (Figure 4, 2) qui sont orientés selon l'axe principal de l'os. Les ostéons sont organisés autour des canaux de Havers, eux-mêmes reliés entre eux par les canaux de Volkmann (Figure 4, 4), où cheminent les vaisseaux nourriciers de l'os. C'est un tissu riche en ostéocytes répartis de façon régulière. Cette partie de l'os est responsable en particulier de la réception des stimuli mécaniques et de leur transmission vers l'os trabéculaire (Figure 4, 5). L'os cortical est recouvert par le périoste (Figure 4, 6), la paroi la plus externe des os.

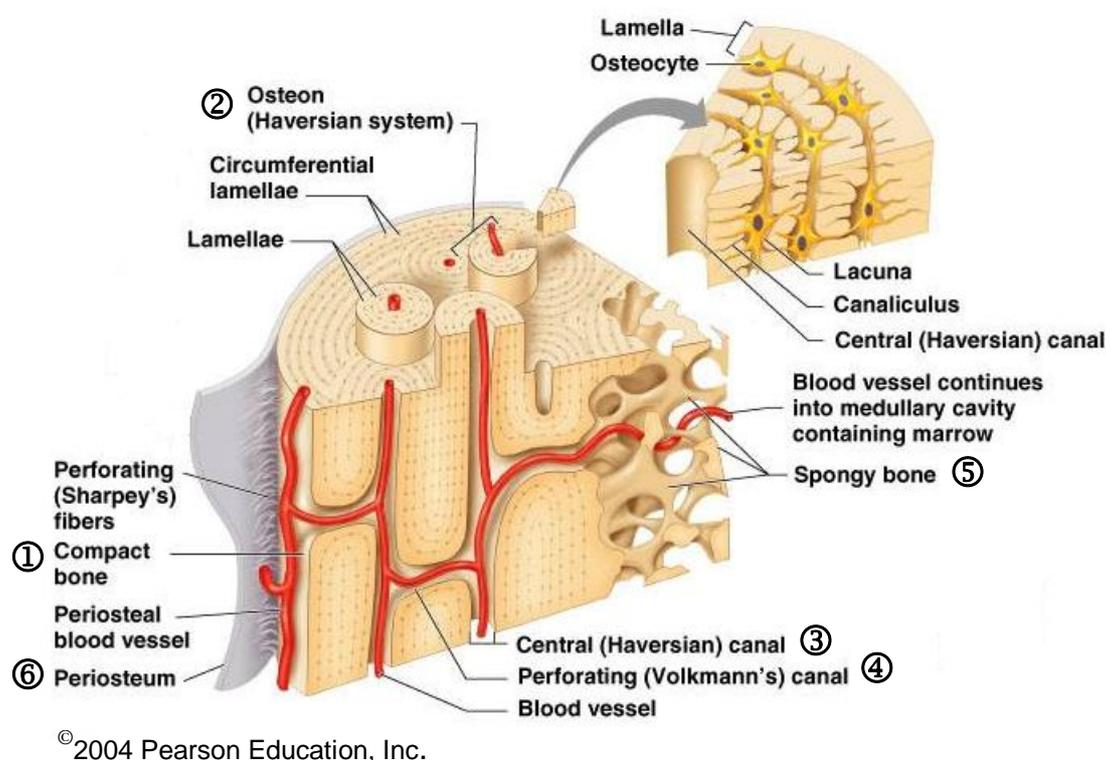


Figure 4 : Microstructure du tissu osseux.

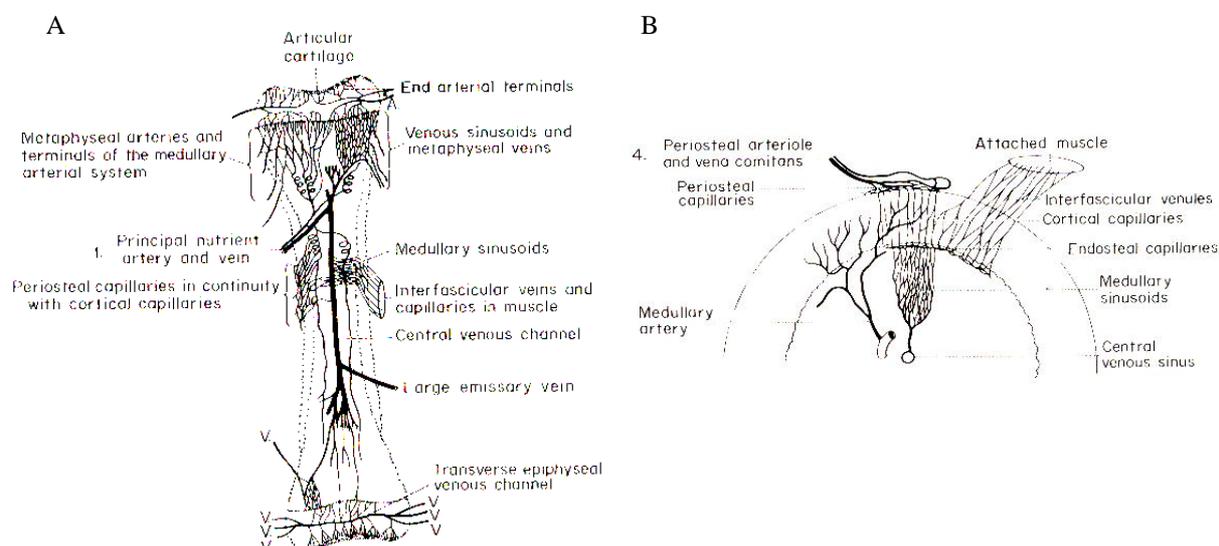
## 2.3. L'os trabéculaire ou spongieux

L'os trabéculaire ou os spongieux (Figure 4, 5), est formé d'un réseau tridimensionnel anisotrope de plaques osseuses reliées entre elles et dont l'orientation préférentielle est déterminée par les forces mécaniques qui s'exercent sur l'os. La géométrie et la distribution des plaques confèrent à l'os trabéculaire résistance et flexibilité avec une densité plus faible que celle de l'os cortical. L'os trabéculaire représente une surface d'échange considérable avec les liquides interstitiels, son renouvellement est plus rapide que celui de l'os cortical. Il joue ainsi un rôle majeur dans l'équilibre phosphocalcique. L'os trabéculaire est donc le lieu principal de l'activité métabolique du tissu osseux. Ce type d'os est présent principalement au niveau des épiphyses des os longs, des os courts et dans les vertèbres.

## 2.4. La vascularisation du tissu osseux

La vascularisation du tissu osseux est essentielle puisqu'elle participe à la formation et au maintien de structures tissulaires présentant des architectures très différentes : les systèmes corticaux, spongieux et médullaires. La vascularisation joue également un rôle fondamental dans les fonctions du tissu osseux : rôle mécanique, rôle hématologique et hémodynamique, rôle métabolique dans l'équilibre phosphocalcique et rôle dans la mobilisation de cellules souches.

La vascularisation d'un os long est assurée par un système artériel richement anastomosé (Figure 5). L'artère diaphysaire irrigue la région diaphysaire et médullaire de l'os, elle se ramifie en artérioles irrigant les zones épiphysaires. Ces artères se ramifient et donnent naissance au réseau endostéal. Les artères situées au niveau des épiphyses et des métaphyses forment un réseau anastomosé dans l'ensemble de l'os trabéculaire. Les artères sont aussi présentes au niveau du périoste à la surface de la diaphyse.



**Figure 5 : Système vasculaire et veineux du tissu osseux.**

(A) Organisation du système artériel et veineux d'un os long. (B) Microvascularisation de l'os en coupe transversale. [Rhineland 1972]

La microcirculation de l'os est assurée par les nombreux capillaires et sinusoides présents au niveau médullaire, cortical et périoste. Les vaisseaux du système cortical circulent dans les canaux de Havers, au centre de l'ostéon mais aussi dans les canaux de Volkman (Figure 5B). Ce réseau intracortical a la particularité de se remanier en permanence parallèlement au remodelage osseux [Parfitt 2000; Choi et al. 2002; Laroche 2002].

Le retour veineux est assuré par un sinus veineux central, composé d'une tunique endothéliale simple, très malléable, et occupant le centre de la diaphyse. Ils drainent l'ensemble des veines métaphysaires, épiphysaires et centromédullaires parallèles au système artériel. Le drainage veineux est également assuré par des veines perforantes traversant directement l'os cortical et se jetant dans le tronc veineux du membre (Figure 5).

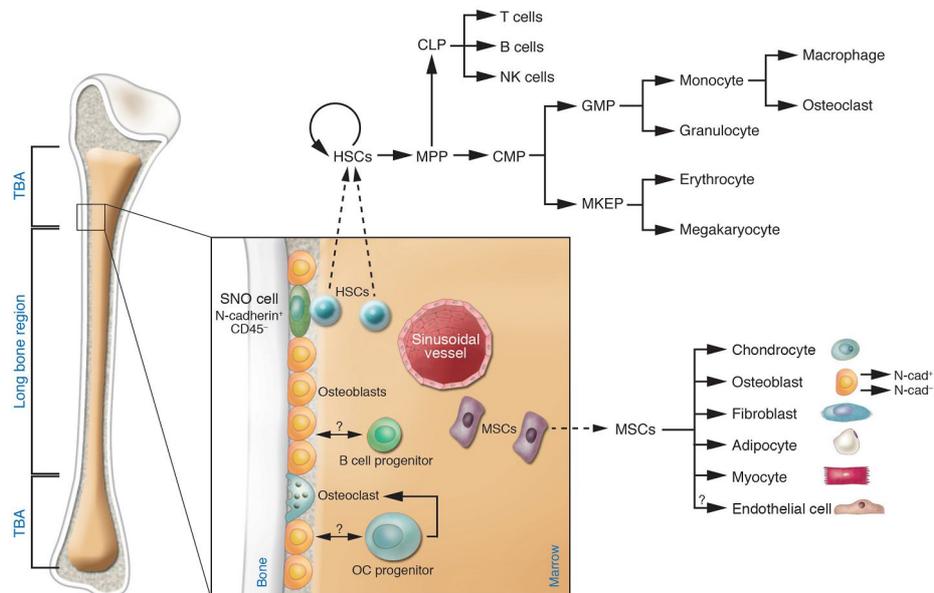
Le réseau artériel d'un os plat est identique à celui des os longs. Par contre les sinus veineux sont multiples, ramifiés, anastomosés et délimités par une simple tunique endothéliale. Ces sinus drainent directement vers les veines corticales.

### 3. Les éléments cellulaires

La moelle osseuse est une niche riche en cellules souches permettant la production de deux lignées cellulaires principales (Figure 6) :

- les cellules souches hématopoïétiques donneront les cellules sanguines et immunitaires (hématies, polynucléaires, macrophages, monocytes, plaquettes, lymphocytes) et les cellules ostéoclastiques, qui dérivent de la lignée monocyttaire.
- les cellules souches mésenchymateuses ou cellules stromales sont à l'origine de différents types cellulaires : cellules endothéliales, adipocytes, myocytes, fibroblastes ainsi que progéniteurs ostéochondraux, qui formeront la lignée ostéoblastique et les chondrocytes.

Au niveau de la niche périvasculaire, les péricytes, cellules sous-endothéliales, constitueraient une source de progéniteurs cellulaires équivalents aux cellules mésenchymateuses [Doherty et al. 1998; Bianco et al. 2001; Shi et al. 2003; Rajantie et al. 2004; Lamagna et al. 2006].



**Figure 6 : Cellules souches de la moelle osseuse.**

Les cellules osseuses dérivent de deux lignées cellulaires souches : les cellules souches mésenchymateuses (MSCs Mesenchymal Stem Cells) pour les ostéochondroprogéniteurs et les cellules souches hématopoïétiques (HSCs : Hematopoietic Stem Cells) pour la lignée ostéoclastique.

[Yin et al. 2006]

#### 3.1. Les cellules ostéoblastiques

##### 3.1.1. Les ostéoblastes

La notion de cellules ostéoblastiques a été décrite dès 1845 par Goodsir et Goodsir [Carnoy 1884]. Le nom d'ostéoblaste n'a été proposé qu'en 1864 par Gegenbaur pour décrire les cellules présentes à la surface de l'os. Goodsir (1845), Tames et De Morgan (1853) ainsi que Müller (1864) décrivent ces cellules comme aplaties, allongées et plus ou moins

ampoulées [Pritchard 1972]. Keith en 1919 écrivit que l'ostéoblaste semble conduire le travail de construction de l'os. C'est en 1951 que Cartier affirma définitivement que l'ostéoblaste est la cellule qui élabore et intervient dans la minéralisation de l'os [Chappard 1989].

Actuellement, l'ostéoblaste est décrit comme étant issu de la différenciation des cellules souches mésenchymateuses. Il a une morphologie cuboïde, le corps cellulaire est polarisé avec un noyau en position basale. Il est caractérisé entre autre par une activité phosphatase alcaline membranaire importante, liée à son rôle dans la minéralisation de la matrice extracellulaire. L'ostéoblaste se situe initialement à la surface de l'os, il synthétise la matrice appelée ostéoïde et en contrôle la minéralisation. Trois devenir s'offrent à lui : au cours de la synthèse de la matrice il peut s'emprisonner dans sa propre matrice et ainsi former un ostéocyte ; il peut entrer dans une phase de quiescence et ainsi s'aplatir sur l'os en cellules bordante ; enfin, il peut entrer en apoptose.

L'ostéoblaste représente seulement 5% des cellules du tissu osseux. Sa durée de vie n'est que de quelques semaines. Cependant, c'est lui qui assure la formation et la régénération du tissu osseux.

### **3.1.2. Les ostéocytes**

Seulement 10% des ostéoblastes se retrouvent enrobés dans leur matrice et forment des ostéocytes. Pourtant, du fait de leur longue durée de vie, ces ostéocytes représentent près de 95% des cellules dans un os mature. Ils ont une durée de vie longue (quelques années).

L'ostéocyte est une cellule avec de longs prolongements cytoplasmiques qui cheminent dans la matrice minéralisée au travers de canaux ou canaliculi. Ces prolongements permettent de faire des contacts intercellulaires entre ostéocytes et cellules bordantes de l'os [Civitelli 2008].

De par sa position dans l'os, l'ostéocyte joue un rôle important dans la physiologie du tissu osseux. Il est impliqué dans la réponse aux contraintes mécaniques, dans le contrôle de la résorption et dans l'homéostasie [Knothe Tate et al. 2004; Bonewald 2007; Noble 2008].

### **3.1.3. Les cellules bordantes**

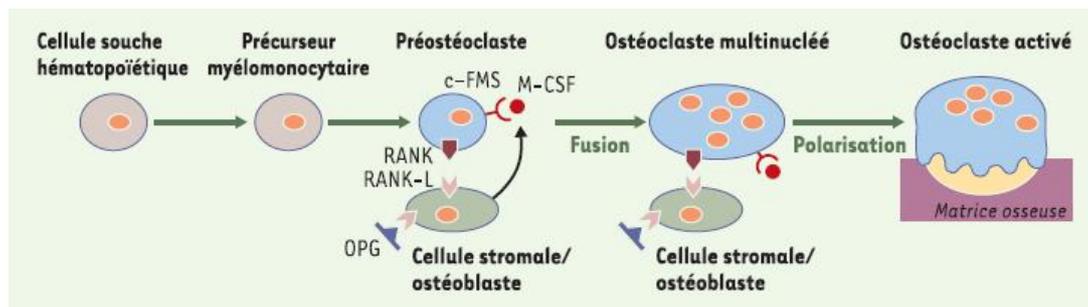
Les cellules bordantes sont des ostéoblastes devenus progressivement aplatis pour former une couche cellulaire à la surface de l'os. Ces cellules constituent une barrière entre l'os et la moelle osseuse. Elles sont en contact et peuvent communiquer avec les ostéocytes et les cellules stromales. Elles constituent une réserve de cellules ostéoblastiques pouvant être mobilisées suite à l'action de facteurs locaux ou systémiques notamment au cours du remodelage et de la réparation osseuse. Ces cellules bordantes sont impliquées dans la réponse directe aux contraintes mécaniques [Mullender et al. 1997; Chow et al. 1998] et aux stimulations hormonales, par la PTH (hormone parathyroïdienne) notamment [Dobnig et al. 1995].

## **3.2. Les ostéoclastes**

L'étude des cellules ostéoclastiques a débuté entre 1849 et 1864 avec les travaux de Robin qui fut capable d'observer ces cellules. Kolliker en 1873 suggère leur rôle dans la résorption.

La physiologie de l'ostéoclaste est actuellement bien connue. L'ostéoclaste est issu de la lignée myélomonocytaire et résulte de la fusion de précurseurs mononucléés [Teitelbaum

2000]. Deux facteurs sont essentiels à l'ostéoclastogénèse, le M-CSF (Macrophage Colony Stimulating Factor) et le ligand RANK-L (Receptor Activator of Nuclear Factor  $\kappa$  B Ligand). Ces facteurs sont synthétisés par les cellules du microenvironnement osseux et se fixent à la surface des progéniteurs ostéoclastiques. Ceux-ci fusionnent pour donner des ostéoclastes multinucléés qui se polarisent au contact de l'os et forment une membrane plissée, siège de la résorption osseuse. La différenciation ostéoclastique est contrôlée par l'ostéoprotégérine (OPG) qui bloque le récepteur au RANK-L. (Figure 7)



**Figure 7 : Etapes de la différenciation des ostéoclastes.**  
[Blin-Wakkach et al. 2004]

L'ostéoclaste est caractérisée par le fait qu'elle est géante (100 $\mu$ m) et multinucléée, et qu'elle présente de marqueurs spécifiques comme la phosphatase acide résistante au tartrate (TRAP, Tartrate Resistant Acid Phosphatase) et la cathepsine K.

L'ostéoclaste est la cellule osseuse responsable de la résorption lors du remodelage osseux qui intervient tout au long de la vie et lors du remaniement de la matrice au cours de la réparation osseuse.

## 4. La matrice extracellulaire du tissu osseux

### 4.1. Composition de la matrice osseuse

L'os est un tissu conjonctif dont les éléments cellulaires sont inclus dans une matrice extracellulaire composée de 20-40% d'éléments organiques (fibres de collagène, peptides, lipides, protéines, polysaccharides, etc...) et de 50 à 70% d'éléments inorganiques (calcium, phosphate, magnésium, etc...) [Hing 2004].

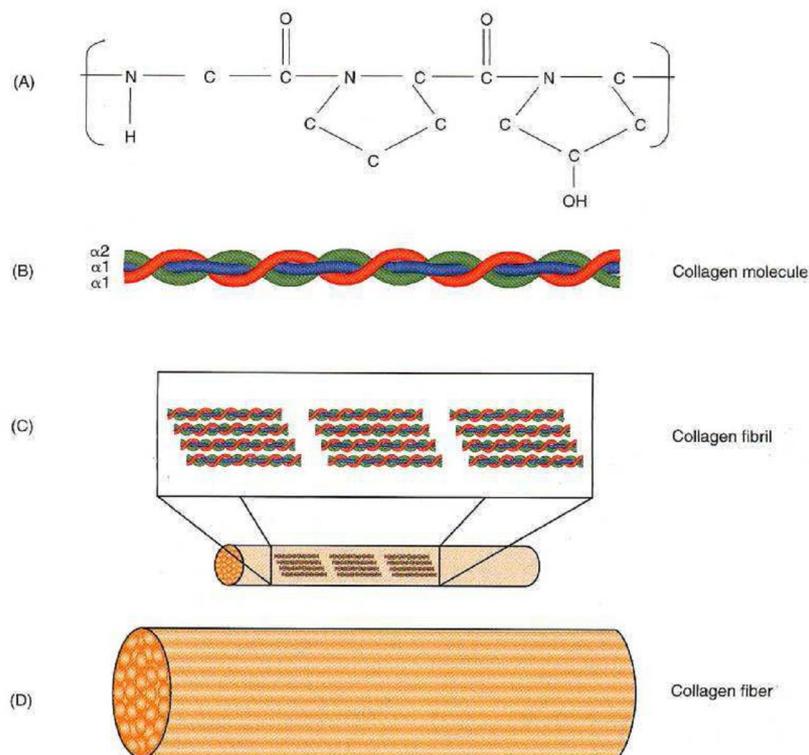
#### 4.1.1. La phase organique

##### 4.1.1.1. Le collagène de type 1 $\alpha$

Les protéines collagéniques sont les constituants majeurs de la matrice extracellulaire. Une chaîne de collagène se caractérise par la présence dans sa séquence de répétitions du motif Gly-X-Y, dans lequel un tiers environ des X sont des prolines et un tiers des Y des hydroxyprolines, acide aminé spécifique des collagènes (Figure 8A). Ce motif permet à trois chaînes de s'associer en triple hélice, grâce à la répétition régulière des glycines et à l'action stabilisante des hydroxyprolines.

La molécule de collagène de type I, prépondérante dans la matrice extracellulaire osseuse, est constituée d'une triple hélice correspondant à un enchevêtrement de deux chaînes identiques  $\alpha 1$  et d'une chaîne  $\alpha 2$  (Figure 8 B).

Les molécules s'alignent ensuite dans la matrice extracellulaire, l'extrémité C-terminale contre l'extrémité N-terminale, pour constituer des fibres, séparées par un espace d'environ 45 nm, et décalées par rapport à leurs voisines d'environ 1/4 de leur longueur (Figure 8C). Il se constitue ainsi au sein des fibres, des « vides » qui fixent les métaux lourds et expliquent l'aspect strié caractéristique des collagènes fibrillaires en microscopie électronique. Ces « vides » jouent un rôle très important dans la minéralisation de la matrice osseuse, comme site de nucléation des premiers cristaux d'hydroxyapatite. Le collagène de type I est dit fibrillaire car il est organisé en fibres au sein de la matrice extracellulaire (Figure 8D).



**Figure 8 : Organisation hiérarchique des fibres de collagène de la matrice extracellulaire.**

(A) Séquence primaire en acides aminés avec répétition de la séquence Gly-X-Y (Gly=Glycine, X=proline, Y=hydroxy proline). (B) Association de trois chaînes en triple hélices de type  $(\alpha 1)_2\alpha 2$  pour former une molécule de collagène de type 1 $\alpha$ . (C) Molécules de collagène regroupées en fibrilles puis en fibre (D).

[Rouwkema 2007]

#### 4.1.1.2. Les protéines non collagéniques

Les protéines non collagéniques de la matrice osseuse (Tableau 1) représentent 10 % environ des protéines totales de la matrice, et peuvent être regroupées en différentes familles. Ces molécules participent à l'organisation macromoléculaire du tissu osseux et pourraient intervenir dans de nombreux aspects de la physiologie osseuse comme les mécanismes de minéralisation, de migration cellulaire (par chimiotactisme) ou encore la régulation du couplage formation/résorption de la matrice osseuse.

Protéines non collagéniques		Protéines plasmatiques	
Ostéocalcine	15-25%	□-HS glycoprotéines	5-10%
Gla-protéines matricielles	2%	Albumine	30%
Ostéonectine	15-25%	Immunoglobulines	<1%
Sialoprotéines	10%		
Protéoglycanes	4%		
Phosphoprotéines	9%	<b>Facteurs de croissance</b>	<1%

**Tableau 1 : Protéines non collagéniques de la matrice osseuse et leur pourcentage respectif par rapport au total des protéines non collagéniques.**  
D'après [P.D. Delmas 1989].

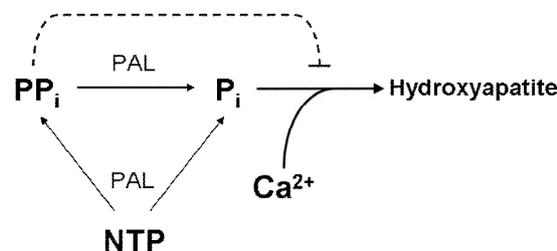
### Les Gla protéines :

Protéines contenant des résidus d'acide  $\gamma$ -carboxyglutamique (Gla), la famille des Gla protéines regroupe trois membres essentiels : l'ostéocalcine ou *bone gla protein* (OCN / BGP), la matrice Gla protéine (MGP) et la protéine S. Les résidus Gla confèrent à ces protéines une forte affinité pour le calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ).

L'ostéocalcine et la MGP sont produites respectivement par les ostéoblastes et les chondrocytes [Luo et al. 1995]. La protéine S quant à elle est exprimée par de multiples types cellulaires (hépatocytes, ostéoblastes, cellules endothéliales). L'ostéocalcine est la protéine non collagénique la plus abondante dans le tissu osseux. Il a été montré que des souris dont le gène codant pour l'ostéocalcine a été invalidé, présentent une augmentation progressive de la masse osseuse, et un contenu minéral osseux plus élevé que les animaux sauvages [Ducy et al. 1996; Luo et al. 1997; Boskey et al. 1998]. L'ostéocalcine agit sur la formation osseuse en contrôlant l'activité des ostéoblastes et comme inhibiteur de la minéralisation [Hunter et al. 1996], tout comme la MGP [Luo et al. 1997].

### Les glycoprotéines (non SIBLINGs)

La phosphatase alcaline, enzyme marqueur des ostéoblastes, est une glycoprotéine initialement attachée à la membrane par un pont phosphoinositol, qui peut être clivé et se retrouver dans la matrice minéralisée. Il semble que son rôle soit prépondérant dans le processus de minéralisation. En effet, elle permet de concentrer les ions phosphates par hydrolyse de substrats organiques phosphorylés (nucléotides triphosphates,  $\beta$ -glycérophosphate) dont les pyrophosphates qui agissent comme des inhibiteurs de la minéralisation (Figure 9) [Balcerzak et al. 2003].



**Figure 9 : Rôle de la phosphatase alcaline (PAL) dans la minéralisation.**

La PAL permet de concentrer les ions phosphate ( $\text{P}_i$ ) par hydrolyse de substrats organiques phosphorylés (Nucléotides tri-phosphate NTP), ainsi que des pyrophosphates ( $\text{PP}_i$ ) qui agissent comme des inhibiteurs de la minéralisation. Les  $\text{P}_i$  en présence de  $\text{Ca}^{2+}$  et d'eau formeront des cristaux d'hydroxyapatite. D'après [Balcerzak et al. 2003]

L'ostéonectine, encore appelée SPARC, représentant environ 2% des protéines osseuses, est une glycoprotéine phosphorylée non spécifique du tissu osseux. Elle présente une forte affinité pour l'hydroxyapatite et le calcium ainsi que pour le collagène de type I.

### Les SIBLINGs

Les protéines de la famille des SIBLINGs vont l'objet d'une revue bibliographique dans l'introduction des articles 2 et 3 de cette thèse en page 85.

### Les protéoglycanes.

Les protéoglycanes sont des macromolécules contenant des chaînes latérales de glycosaminoglycanes [Lamoureux et al. 2007]. Durant les premiers stades de développement de l'os, versicane, chondroïtine sulfate et hyaluronane, non attachés à un corps protéiques sont produits et servent à délimiter les zones qui deviendront de l'os. Dans l'os adulte, la décorine et le biglycane, appartenant à la famille des protéoglycanes riches en leucine (SLRP : small Leucin-Rich Proteoglycan) sont majoritaires. La décorine est impliquée dans la fibrillogenèse du collagène. La délétion du gène du biglycane chez la souris conduit à une diminution significative de l'os trabéculaire, indiquant son rôle positif dans la formation osseuse [Fleischmajer et al. 1987]. Cet effet pourrait être lié à la capacité du biglycane, comme de la décorine, à fixer et moduler l'activité des molécules de la famille TGF- $\beta$  [Yamaguchi et al. 1990; Takeuchi et al. 1994]. Par cette propriété, ces protéoglycanes peuvent moduler indirectement la prolifération et la différenciation cellulaire.

### Les facteurs de croissance et protéines sériques

Les protéines plasmatiques et les différents facteurs de croissance sont séquestrés dans la matrice osseuse et ne représentent que 2 à 4% des protéines totales de la matrice. Cependant, les facteurs de croissance comme le TGF $\beta$ , le VEGF, le bFGF ou encore l'IGF ont la capacité de réguler le remodelage osseux lorsqu'ils sont libérés [Solheim 1998].

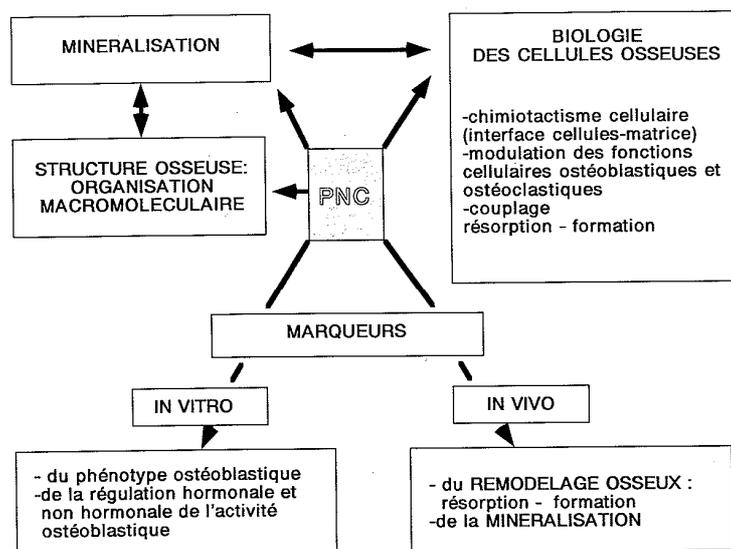


Figure 10 : Fonctions des protéines non collagéniques (PNC) de la matrice extracellulaire du tissu osseux. [P.D. Delmas 1989]

### 4.1.2. La phase minérale

La phase minérale représente 50 à 70 % de la masse de la matrice osseuse. Ce pourcentage est variable en fonction de différents facteurs tels que l'âge, la localisation sur le squelette, l'alimentation, l'activité physique, ainsi que de nombreux paramètres métaboliques, endocrinologiques.

La phase minérale est constituée essentiellement de cristaux voisins de l'hydroxyapatite de calcium de formule générale  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ . Ces derniers ont la forme de petites aiguilles de quelques centaines d'angströms de longueur, conférant à l'os sa solidité et ses propriétés mécaniques. Ils contiennent en faible quantité de nombreuses espèces ioniques qui lui confèrent une structure et des propriétés sensiblement différentes de celles de l'hydroxyapatite.

Le dépôt du minéral entre les fibres de collagène, ou minéralisation, est un phénomène complexe impliquant des processus biologiques et physico-chimiques (voir paragraphe 4.3. La biominéralisation de la matrice osseuse).

De par sa composition en minéraux, cette phase inorganique joue un rôle important dans l'homéostasie (Tableau 2).

	Ca	P	Mg	Na	K	CO <sub>3</sub>	F	Cl	Sr, Zn, Cu	Ratio Ca:P
McConnel (1973)	26,7	12,5	0,44	0,73	0,06	3,48	0,07	0,08	Sr = 0,04	1,66
Driessens (1980)	36,7	16,0	0,46	0,77	—	8,00	0,04	—	—	1,77
Aoki (1991)	34,0	15,0	0,50	0,80	0,20	1,60	0,08	0,20	—	1,75
LeGreos (1993)	24,5	11,5	0,55	0,70	0,03	5,80	0,02	0,10	traces	1,65

Tableau 2 : Composition de la phase minérale de la matrice osseuse.  
D'après [Hing 2004]

## 4.2. La biominéralisation de la matrice

### 4.2.1. La biominéralisation

Le processus de minéralisation peut être divisé en l'établissement d'une matrice minéralisée primaire dans laquelle la nucléation du minéral peut se faire *de novo*, suivie d'une croissance, d'une expansion et d'une maturation du cristal afin de produire une structure voisine de l'hydroxyapatite.

La biominéralisation est un mécanisme complexe combinant un processus physico-chimique dit passif et un biologique qualifié d'actif. Il y a deux étapes essentielles dans la minéralisation. La première étape consiste en la nucléation d'un cristal de 100 nm, la seconde est la propagation ou la phase de croissance du minéral.

Différentes structures cellulaires ou organelles ont été proposées dans l'initiation et le contrôle de la nucléation du minéral : les vésicules matricielles [Anderson 1995], les *biomineralization foci* (BMF), les cristaux fantômes (crystal ghosts) [Bonucci 2002], les calcosphérulites [Aaron et al. 1999] et les fibrilles de collagène [Glimcher 1989].

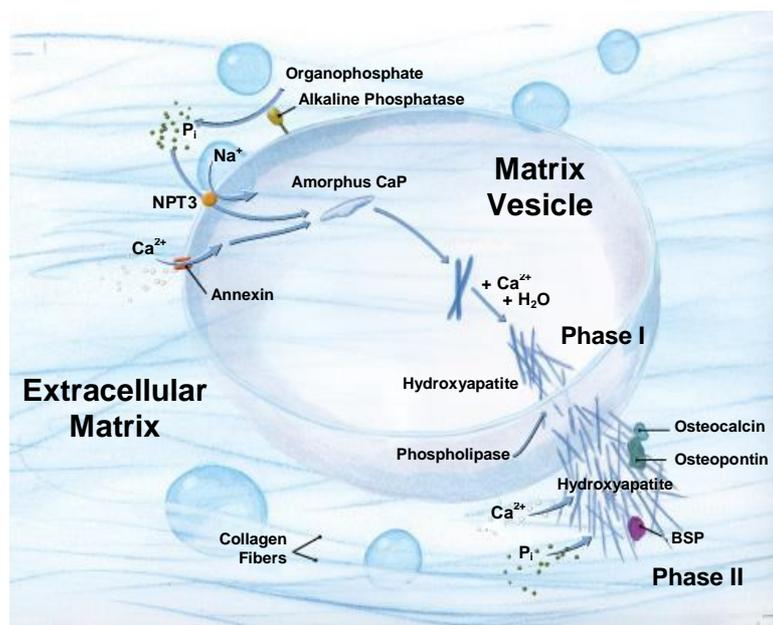
- La minéralisation de la matrice par vésicules matricielles (Figure 11 et Figure 12)

Ce mécanisme a été très étudié et résumé dans les travaux d'Anderson [Anderson 1995; Anderson et al. 2005]. Deux phases se succèdent dans le dépôt du minéral osseux. La phase 1 débute par la génération de vésicules dites vésicules matricielles, de 100 nm de diamètre, à

l'interface entre l'ostéoblaste et l'ostéoïde. Ces vésicules contiennent des enzymes (Phosphatase alcaline, anhydrase carbonique, pyrophosphatase), des protéines membranaires (annexine V, transporteur sodium/phosphate) et des protéines de la matrice extracellulaire (ostéopontine, sialoprotéine osseuse, ostéonectine, ostéocalcine). L'exocytose de ces vésicules est dépendante de l'annexine V [Balcerzak et al. 2003; Kirsch 2005]. Les vésicules s'attachent au collagène matriciel, collagène I dans l'os et collagène II et IX pour le cartilage.

La première phase conduit à la formation d'une vésicule contenant un cristal de phosphate de calcium. La phosphatase alcaline va produire un gradient de phosphate  $\text{PO}_4^{3-}$  en périphérie de la vésicule et permettre ainsi son entrée dans la vésicule via un transporteur Sodium/phosphate [Montessuit et al. 1995]. Le calcium emprunte un canal formé par un complexe d'annexine V. Lorsque la concentration intra-vésiculaire en ions est suffisamment élevée, un précipité, non cristallin, amorphe, de phosphate de calcium ( $\text{CaPO}_4$ ) se forme. Ce précipité va ensuite donner du phosphate octacalcium puis un premier cristal d'hydroxyapatite. La croissance du cristal se poursuit jusqu'à que celui-ci transperce la membrane de la vésicule et se retrouve au niveau de la matrice extracellulaire. Commence alors la phase II de la minéralisation. La membrane vésiculaire est complètement dissociée grâce à l'action des phospholipides et protéases libérées lors de l'éclatement de la vésicule.

La propagation du cristal d'hydroxyapatite va dépendre des paramètres physico-chimiques du fluide matriciel (pH, concentration ionique) et de sa composition protéique. La présence de certaines calciprotéines comme la BSP [Hunter et al. 1993], l'ostéonectine [Boskey et al. 2003], l'ostéocalcine [Ducy et al. 1996] ou certains protéoglycanes acides [Dziewiatkowski et al. 1985] peut moduler la minéralisation. Les phosphoesters comme l'ATP [Garimella et al. 2006], l'AMP ou le pyrophosphate peuvent inhiber la croissance du cristal. La nature même des fibres de collagène influence sur la calcification de la matrice [Kirsch et al. 1994].



**Figure 11 : Minéralisation de la matrice osseuse par les vésicules matricielles.**

La minéralisation débute par une phase passive due à la concentration élevée en  $\text{P}_i$  et  $\text{Ca}^{2+}$  au sein des vésicules matricielles sécrétées par l'ostéoblaste (Phase I). La croissance du cristal se poursuit jusqu'au sortir de la vésicule. Dans la matrice extracellulaire, la nucléation et l'ancrage sur les fibres de collagène est régulée par différents facteurs dont des protéines non-collagéniques comme l'ostéopontine et la BSP (sialoprotéine osseuse) (phase II). [http://www.rndsystems.com/rnd\\_page\\_objectname\\_mr07\\_p2.aspx](http://www.rndsystems.com/rnd_page_objectname_mr07_p2.aspx)

- Les cristaux fantômes

Ils ont été décrits par Bonucci comme des structures organiques masquées par le minéral et qui ne sont identifiables qu'après décalcification. Des structures sphériques calcifiées d'une taille inférieure au millimètre appelées calcosphérulites ou agrégats de cristaux fantômes ont été décrites par Boyde en 1978 et dans des cultures primaires d'ostéoblastes [Nanci et al. 1996]. Ces structures ont aussi été identifiées comme des microsphères calcifiées dans l'os bovin [Aaron et al. 1999].

- Les calcosphérulites

Ces structures vésiculaires formées à partir des corps cellulaires et des prolongements ont été observées dans les ostéoblastes et les ostéocytes [Barragan-Adjemian et al. 2006]. Elles semblent se minéraliser avant de se séparer du corps cellulaire (Figure 12).

- Les *Biominerization foci (BMF)*

Structures larges, de taille proche de celle d'une cellule, les BMF (Figure 12) ont été décrits dans différentes lignées ostéoblastiques [Midura et al. 2004]. Des structures analogues sont observées lors du développement du périoste et dans la formation d'os après ablation de la moelle osseuse [Gorski et al. 2004]. Elles interviennent dans l'initiation de la minéralisation au cours l'ostéogenèse intramembranaire. Les BMF se composent de fines fibres et de vésicules incluant des molécules marqueurs comme la BSP ou BAG-75 qui sont associées à la minéralisation [Gorski et al. 2004; Midura et al. 2004]. Après l'initiation de la minéralisation, les BMF sont désassemblés et la propagation se fait au sein de la matrice extracellulaire. [Midura et al. 2007]

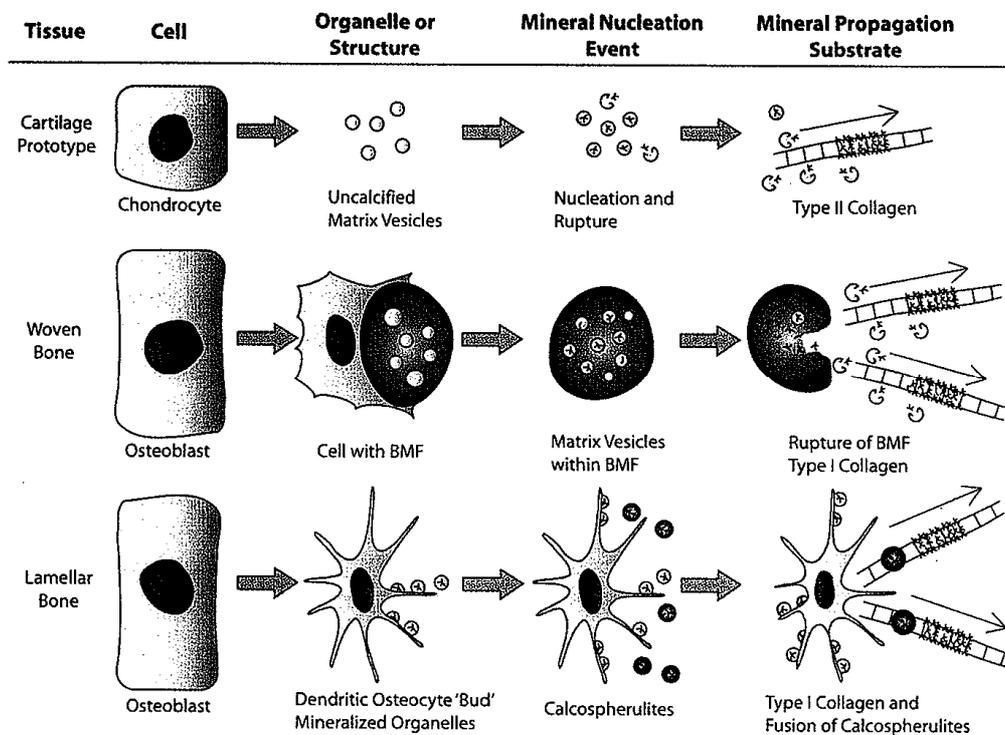


Figure 12 : Contrôle de la nucléation et de la propagation du minéral osseux par différents systèmes d'organelles dérivant des cellules osseuses.

[Bonewald et al. 2009]

- Les fibrilles de collagène

Glimcher a proposé que les fibres de collagène, associées aux phosphoprotéines matricielles (OPN, BSP...) initient la nucléation dans des régions de trous. Ces trous correspondraient à des zones moins riches en acides aminés liés au décalage des fibrilles de collagène où les ions  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{PO}_4^{3-}$  s'accumulent et forment les premiers cristaux d'hydroxyapatite [Glimcher 1989].

#### 4.2.2. Les modulateurs de la minéralisation

Les ions  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{PO}_4^{3-}$  et leur concentration, jouent un rôle crucial dans la régulation de la minéralisation. Des problèmes d'homéostasie phospho-calcique entraînent des pathologies associées à des défauts de minéralisation comme l'ostéomalacie [Harmey et al. 2004].

De nombreuses protéines matricielles interviennent dans la régulation de la minéralisation de par leur propriété sur la nucléation du minéral, sur le métabolisme ionique ou sur la formation de la matrice organique.

Du fait que leur inactivation entraîne une hypo- ou une hyper-phosphatémie, il a été proposé que les protéines PHEX, MEPE, DMP1 sont impliquées dans la régulation de la minéralisation du tissu osseux. La délétion chez la souris des gènes codant pour PHEX ou DMP1 induit un phénotype appelé *Hyp*, correspondant à une hypophosphatémie reliée à une élévation de la concentration sérique en FGF23 et à une diminution de la masse osseuse, suggérant un rôle activateur de ces protéines sur la minéralisation [Quarles 2003; Liu et al. 2008]. La déficience en MEPE entraîne une hyperphosphatémie et un phénotype d'hyperminéralisation du tissu osseux [Gowen et al. 2003].

La localisation de la BSP dans le processus de calcification (vésicules matricielles notamment) suggère son implication dans la minéralisation. Hunter a montré *in vitro* que la BSP est un activateur de cette dernière [Hunter et al. 1996; Gordon et al. 2007].

De nombreuses protéines de la matrice extracellulaire sont impliquées dans le contrôle et la régulation de la minéralisation du tissu osseux comme résumé dans le Tableau 3.

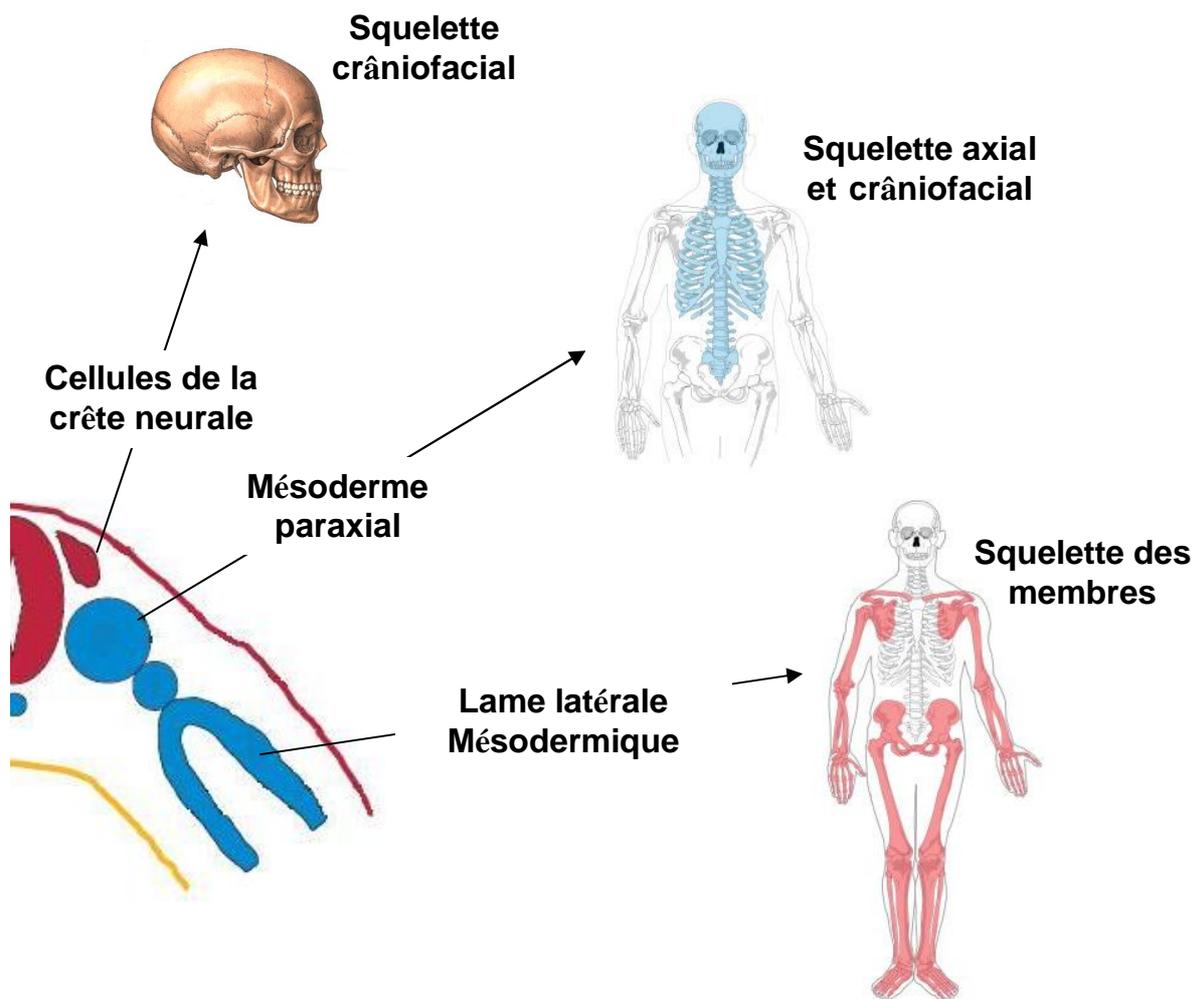
Marker	Expression in Skeletal Tissues	Function in Mineralization	Marker	Expression in Skeletal Tissues	Function in Mineralization
Bone specific Alkaline Phosphatase, TNAP	Early to late osteoblast, early osteocyte	Generates inorganic phosphate from phosphate esters	BSP	Osteoblasts	Nucleator of mineralization
nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase (PC-1)		Degrades pyrophosphate, an inhibitor of mineralization	BAG-75	Osteoblasts (primary bone)	Biomarker for biomineralization foci, calcium binding
Matrix-Gla-protein (MGP)	Expressed in all tissues	Inhibitor of mineralization	Osteopontin, OPN	Many tissues	Inhibitor of mineralization
$\alpha_2$ -HS or fetuin A	Produced in liver, circulates in blood	Binds HA and inhibits growth	Decorin		Organizer of matrix
PHEX	Early and late osteocytes	Metalloproteinase essential for normal biomineralization and phosphate metabolism	Biglycan		
DMP1	Early and mature osteocytes	Phosphate metabolism and mineralization	Fibronectin		Scaffold or matrix template
OF45/MEPE	Late osteoblast through osteocytes	Inhibitor of bone formation/regulator of phosphate metabolism	Aggrecan		Inhibitor of crystal formation
FGF23	Early and mature osteocytes	Regulated by PHEX and DMP1, targets the kidney and induces hypophosphatemia	Osteocalcin	Late osteoblasts, osteocytes	May regulate glucose metabolism, not biomineralization

**Tableau 3 : Régulateurs de la minéralisation osseuse.**  
[Bonewald et al. 2009]

## 5. Origine et formation du tissu osseux

Au cours de l'ontogenèse, les cellules participant à la mise en place du squelette dérivent de trois lignages cellulaires différents [Couly et al. 1993; Olsen et al. 2000] (Figure 13) :

- les cellules de la crête neurale donnent le squelette crâniofacial
- le mésoderme paraxial contribue à la fois au squelette crâniofacial et à la majorité du squelette axial (vertèbres), ceci en formant les somites qui donneront le sclérotome, tissu qui se différencie en tissu osseux ;
- la lame latérale du mésoderme forme le squelette des membres.



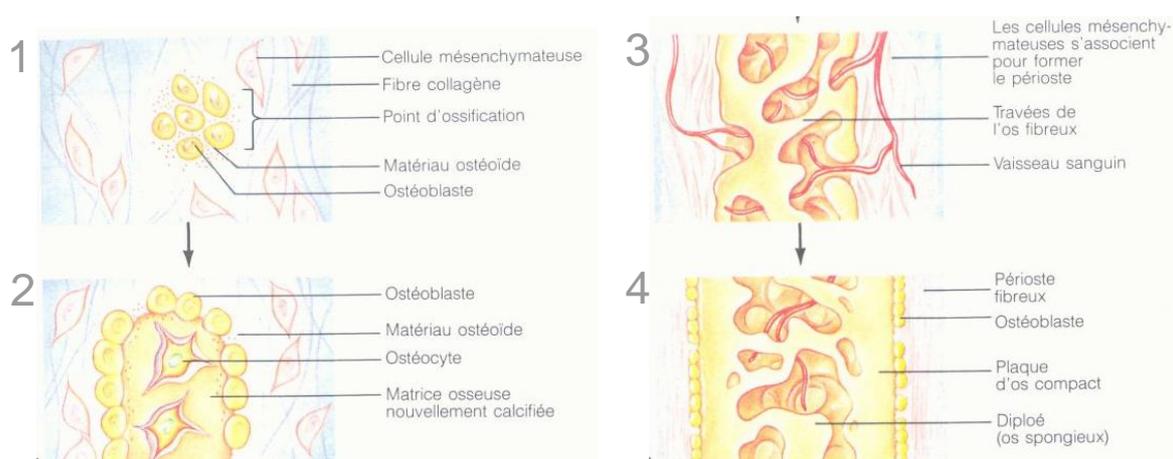
**Figure 13 : Origines embryonnaires des os du squelette dans un embryon de stade précoce.**  
*Dans l'embryon : Ectoderme (rouge), Endoderme (Jaune), Mésoderme (Bleu).*

Quelle que soit l'origine embryonnaire, des régions où se forment les os, les cellules à l'origine de l'os sont des cellules mésenchymateuses. Ces cellules se condensent puis se différencient soit en ostéoblastes soit en chondrocytes (Hall & Miyake 1992). Deux procédés permettent de construire les différents os du squelette :

- l'ossification intramembranaire concourt à la formation des os dits plats
- l'ossification endochondrale est à la base de la formation des os dits longs.

## 5.1. Ossification intramembranaire

L'ossification intramembranaire concourt à la formation des os plats tels que la voûte du crâne, le maxillaire, le corps de la mandibule et la clavicule. Elle se caractérise par la condensation de cellules mésenchymateuses dans une zone richement vascularisée. Ces cellules vont proliférer puis se différencier progressivement en pré-ostéoblastes puis en ostéoblastes. Cette différenciation est concomitante de la production de matrice constituée de fibres de collagène non orientées, en amas non réguliers. Les ostéoblastes situés au cœur de ce centre d'ossification se retrouvent progressivement emprisonnés dans leur matrice, formant ainsi des ostéocytes larges (**Figure 14**). La matrice osseuse va progressivement être minéralisée. L'os ainsi formé est qualifié d'os tissé (*woven bone*). A la périphérie, les cellules mésenchymateuses continuent de se différencier selon ce processus d'ossification primaire. Par la suite l'os tissé sera remodelé pour générer un os lamellaire mature dans lequel les fibres de collagène seront orientées parallèlement et les ostéocytes disposés de façon régulière (ossification secondaire). Au cours du remodelage, les vaisseaux sanguins s'orientent dans l'axe de l'os et le tissu hématopoïétique se met en place entre les travées d'os présents au centre de la structure. A l'extérieur de celle-ci est formé un os compact. [Baron 1996; Olsen et al. 2000; Olsen 2006]



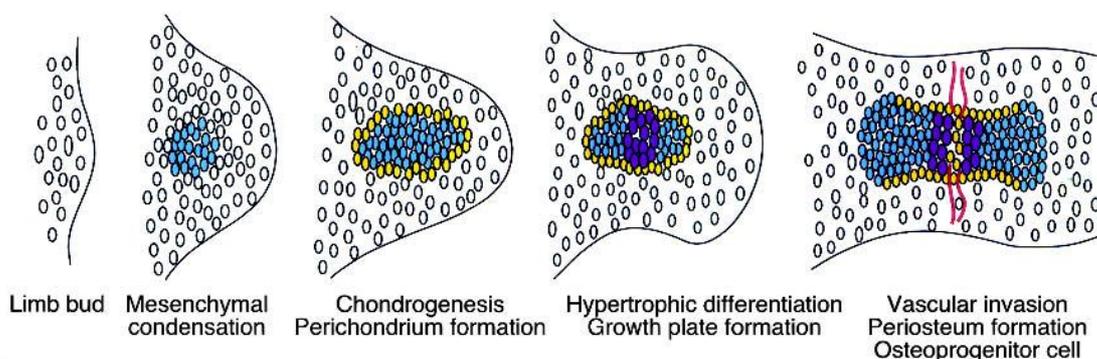
**Figure 14 : Mécanisme d'ossification primaire (ossification intramembranaire).**

Les cellules mésenchymateuses se condensent (1) puis se différencient en pré-ostéoblastes puis en ostéoblastes sécrétant une matrice collagénique d'organisation tissée formant de l'os dit tissé (2). Cet os est remodelé et envahit par des vaisseaux (3). En périphérie le remodelage forme de l'os lamellaire mature compact bordé d'un périoste et d'un endoste. Des travées persistent au centre, entre lesquelles se forment progressivement le tissu hématopoïétique (4).

Image tirée de <http://croissancedesos.ifrance.com/dossier.html>

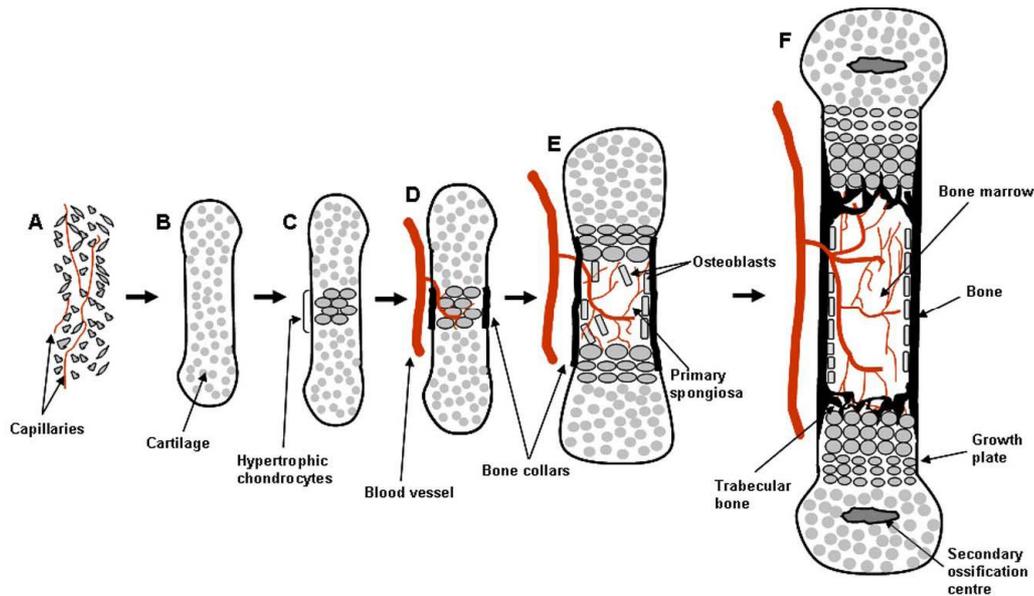
## 5.2. Ossification endochondrale

L'ossification endochondrale est à l'origine des os longs (fémur, tibia, etc). Ces derniers se développent à partir d'une ébauche cartilagineuse formée à la suite de la condensation de cellules mésenchymateuses puis à leur différenciation en chondrocytes (Figure 15). La forme de l'agrégat de cellules condensées préfigure celle du futur os (Figure 16). Contrairement à l'ossification intramembranaire la mise en place de l'ébauche osseuse se fait dans une matrice non vascularisée. Au centre, les chondrocytes s'emprisonnent progressivement dans leur propre matrice. Ils ne prolifèrent plus et s'hypertrophient. Ils sécrètent alors des facteurs angiogéniques. En surface du manchon cartilagineux, les cellules mésenchymateuses du périchondre se différencient en ostéoblastes qui formeront par la suite le périoste et la diaphyse. Cette zone constitue le premier centre d'ossification. Les cellules du périoste envahissent la zone de chondrocytes hypertrophiques, en même temps que les vaisseaux sanguins et des cellules hématopoïétiques. Au cœur de la matrice cartilagineuse, les chondrocytes hypertrophiques meurent par apoptose, le cartilage est ainsi dégradé puis remplacé par de l'os trabéculaire déposé par les ostéoblastes. La dégradation de la matrice laisse place à l'expansion des cellules stromales formant la moelle osseuse. L'ossification endochondrale se poursuit de façon centrifuge en direction des épiphyses dans lesquelles apparaissent des centres d'ossification secondaire. La plaque de croissance, formée par des colonnes de chondrocytes, se met en place entre la diaphyse et l'épiphyse. La régulation synchronisée de la prolifération, de la différenciation, de l'hypertrophie des chondrocytes, de l'angiogenèse et l'ossification intramembranaire permet la croissance de l'os. [Baron 1996; Olsen et al. 2000; Olsen 2006; Kanczler et al. 2008; Shapiro 2008]



**Figure 15 : Premiers stades de l'ossification endochondrale.**

Le développement du tissu osseux par ossification endochondrale commence par la condensation de cellules mésenchymateuses exprimant du collagène de type II (bleu). Ces cellules se différencient en chondrocytes qui s'hypertrophient et expriment du collagène de type X (violet). Le périchondre est riche en ostéoprogéniteurs exprimant le collagène de type I (jaune). La mise en place du premier centre d'ossification s'accompagne de la vascularisation de la structure (rouge). [Ornitz et al. 2002]



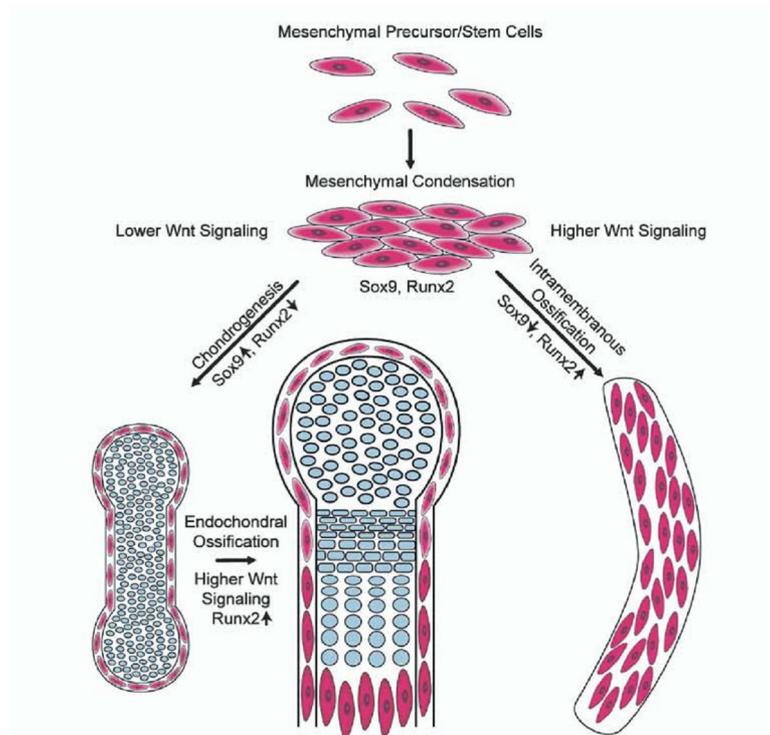
**Figure 16 : Formation d'un os long par ossification endochondrale.**

(A) Condensation des cellules mésenchymateuses. (B) Différenciation des cellules en chondrocytes dans un environnement non vascularisé et formation d'une ébauche cartilagineuse. (C) Prolifération et hypertrophie des chondrocytes. (D) Différenciation des cellules adjacentes au cartilage hypertrophique en ostéoblastes. Libération de facteurs pro-angiogéniques, calcification de la matrice cartilagineuse, apoptose des chondrocytes. Formation d'un centre d'ossification primaire. (E) Vascularisation et formation d'une spongieuse primaire au centre de l'os. Croissance de l'os par séquence de prolifération et hypertrophie des chondrocytes. Remplacement de la spongieuse primaire par un os fibreux primaire formé par les ostéoblastes. Elaboration d'os cortical en périphérie et d'os trabéculaire dans la spongieuse primaire. (F) Développement de centres d'ossification secondaire dans les épiphyses, des plaques de croissance avec colonne de chondrocytes prolifératifs. Expansion de cellules stromales dans la cavité osseuse. [Kanczler et al. 2008]

### 5.3. Régulation de l'ossification intramembranaire et endochondrale

Au cours de la squelettogenèse, la différenciation des cellules mésenchymateuses en ostéoblastes ou en chondrocytes est contrôlée par la voie canonique Wnt. Ainsi la liaison d'un ligand de la famille Wnt au récepteur membranaire Frizzled et au corécepteur Lrp5/6 protège de la dégradation par la  $\beta$ -caténine. Celle-ci s'accumule dans le cytoplasme des cellules mésenchymateuses, entre dans le noyau et contrôle la transcription de gènes cibles. La  $\beta$ -caténine active ainsi l'expression de gènes nécessaires à la différenciation ostéoblastique [Day et al. 2005; Phillips 2005] et inhibe ceux de la chondrogenèse [Zhu et al. 2005; Davis et al. 2008].

L'un des facteurs transcrits lors de l'activation de la voie Wnt est CBFA1/RUNX2. En retour CBFA1 induit l'expression d'un second facteur de transcription ostéoblastique Osterix (OSX) conduisant à la différenciation des cellules mésenchymateuses en cellules ostéoblastiques [Luo et al. 1997; Otto et al. 1997].



**Figure 17 : Rôle de la voie canonique Wnt/ $\beta$ -caténine dans la balance entre ossification endochondrale / intramembranaire.**

L'activation de la voie canonique Wnt inhibe la différenciation des cellules mésenchymateuses du bourgeon osseux en chondrocytes (bleu) et favorise la formation des ostéoblastes (rouge) et l'ossification intramembranaire. Wnt/ $\beta$ -caténine inhibe l'expression du facteur de transcription chondrogénique Sox9 et favorise celle du facteur ostéoblastique Runx2/CBFA1.

[Day et al. 2005; Day et al. 2008]

La différenciation en chondrocytes se produit en présence de faible concentration de  $\beta$ -caténine cytoplasmique. Il en résulte une augmentation de l'expression du gène maître (*master gene*) contrôlant la chondrogenèse, le facteur de transcription SOX9 [Akiyama et al. 2002; Akiyama 2008]. Le facteur SOX9 permet d'activer l'expression de gènes marqueurs des cellules chondrogéniques tels que l'aggrécane [Sekiya et al. 2000] et le collagène de type  $2\alpha 1$  [Zhou et al. 1998].

Le FGF (Fibroblast Growth Factor) pourrait également jouer un rôle important dans l'induction des ostéochondroprogéniteurs au cours de l'ossification endochondrale. La famille du FGF comporte vingt-deux ligands et quatre isoformes de récepteurs [Ornitz et al. 2002; Ornitz 2005].

Au cours de l'organogenèse, la formation du bourgeon mésenchymateux est associée à une modification de l'expression des récepteurs au FGF (FGFR). Ainsi les cellules au centre du bourgeon expriment les isoformes 2 et 3 (FGFR2 et FGFR3) alors que celles de la périphérie expriment FGFR1. Par ailleurs, Jacob et Iwata rapportent respectivement que FGFR1 est impliquée dans la maturation des ostéochondroprogéniteurs mésenchymateux en ostéoblastes et que FGFR3 est un marqueur précoce dans la chondrogenèse [Iwata et al. 2000; Jacob et al. 2006]. FGF apparaît dès lors comme un acteur potentiel dans le switch entre une différenciation chondrale et ostéoblastique.

## 6. Physiologie osseuse

La balance entre formation et résorption osseuse (**Figure 18**) varie au cours de la vie et en fonction de nombreux paramètres (activités physiques, alimentation, pathologies,...). Cette balance est fortement déséquilibrée au moment de la croissance et par la pratique d'une activité physique régulière en faveur de la formation osseuse ou induisant un gain de masse osseuse. A l'inverse, la résorption peut être favorisée par des déséquilibres hormonaux, comme c'est le cas dans l'ostéoporose induite par la ménopause, conduisant à des pertes osseuses. Dans des conditions d'équilibre, la formation et la résorption sont toujours actives, elles assurent de concert le remodelage osseux, sans perte ni gain de masse osseuse.

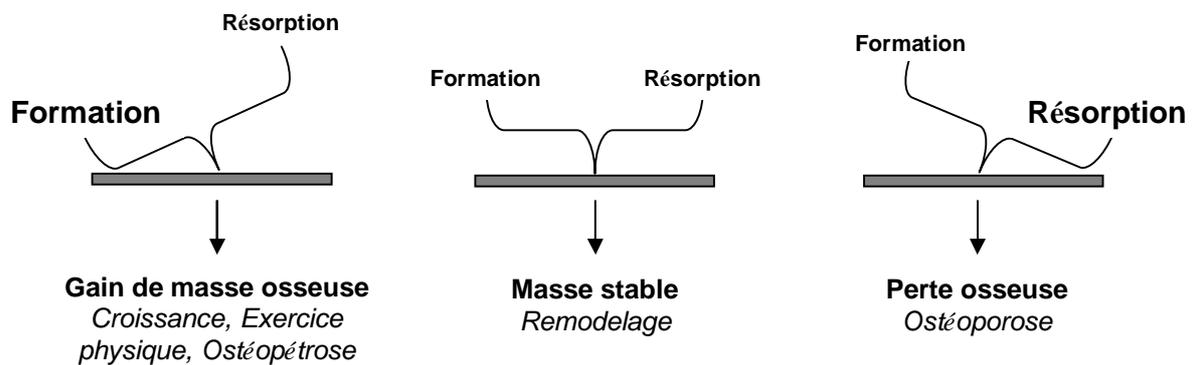


Figure 18 : Balance entre formation et résorption osseuses.

### 6.1. Le modelage et remodelage du tissu osseux

#### 6.1.1. Le modelage osseux

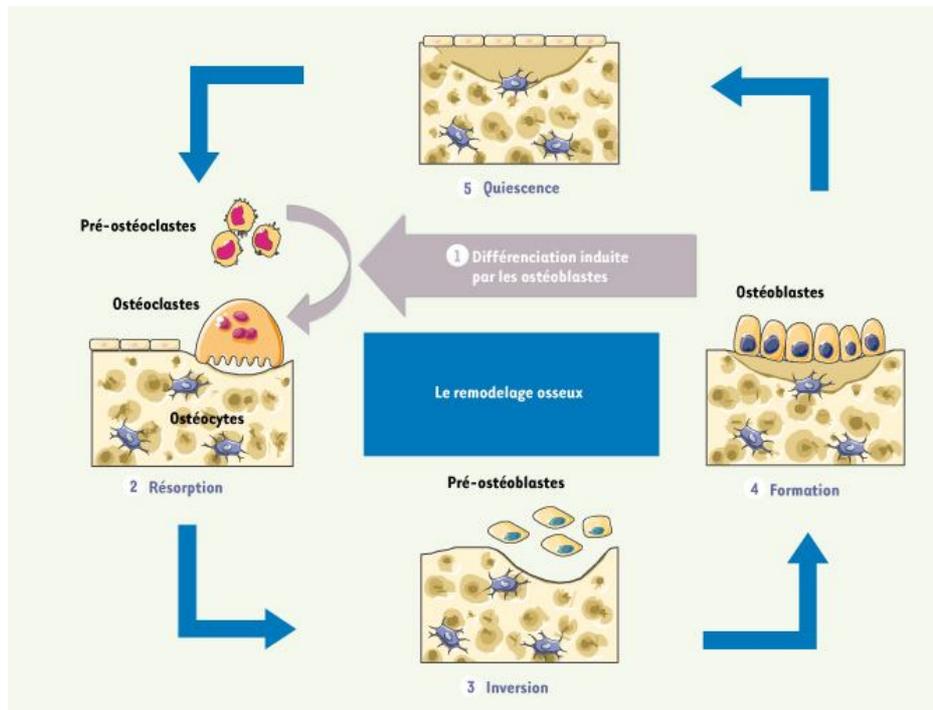
Le modelage décrit le processus de formation de l'os par l'action indépendante des ostéoblastes de celle des ostéoclastes. Il apparaît notamment lors de la croissance ou en réponse à un stress mécanique. C'est l'exemple bien connu des sportifs dont le squelette des membres les plus sollicités et subissant des contraintes mécaniques régulières et répétées, présente une augmentation de masse osseuse [Haapasalo et al. 2000].

#### 6.1.2. Le remodelage osseux

Le tissu osseux est un tissu dynamique, il est sans cesse remanié par un mécanisme associant étroitement les phénomènes de résorption et de formation. Ce remaniement intervient tout au long de la vie et au cours des processus de réparation de lésions. Ce remaniement permet en particulier au tissu osseux de s'adapter et de modifier sa structure en fonction des contraintes mécaniques et/ou biochimiques environnantes, il permet aussi d'éliminer un os usé, présentant des microcracks par exemple, et de le remplacer. Le remodelage se réalise par un mécanisme en quatre étapes (Figure 19).

- L'activation : elle permet l'activation des cellules quiescentes de la surface osseuse et le recrutement de précurseurs ostéoclastiques mononucléés de la circulation sanguine. Les pré-ostéoclastes se fixent à la matrice organique par interaction de récepteurs membranaires via des peptides RGD de protéines matricielles. Cette interaction va conduire à la formation d'un anneau de scellement caractérisé par la polymérisation de l'actine squelettique [Nakamura et al. 2003]. Il se crée alors entre la matrice osseuse et l'ostéoclaste un compartiment ou cavité de résorption. La formation des ostéoclastes, leur activation et le contrôle de leur activité de résorption sont régulés par des cytokines locales telles que RANKL, IL-1 et IL-6, CSFs et par des hormones systémiques, PTH, 1-25-dihydroxyvitamine D3 et calcitonine [Roodman 1999; Boyle et al. 2003].

- Durant la phase de résorption, les pompes à protons de la membrane dite basale de l'ostéoclaste, transfèrent des protons vers la cavité de résorption, diminuant considérablement le pH de celle-ci. Le pH atteint une valeur de 4 [Silver et al. 1988]. Cette acidification s'accompagne de la sécrétion d'enzymes lysosomales telles que la TRAPC, la cathepsine K, la métalloprotéase MMP-9 et la gélatinase [Delaisse et al. 2003]. Acidité et enzymes vont permettre la digestion de la matrice organique et la dissolution du minéral. La résorption a depuis longtemps été décrite comme le résultat de l'action de cellules polynucléées. Des études menées *in vitro* et *in vivo* suggèrent également le rôle de cellules mononucléées. La résorption s'achève par l'apoptose des ostéoclastes, elle est suivie d'une phase de réversion.

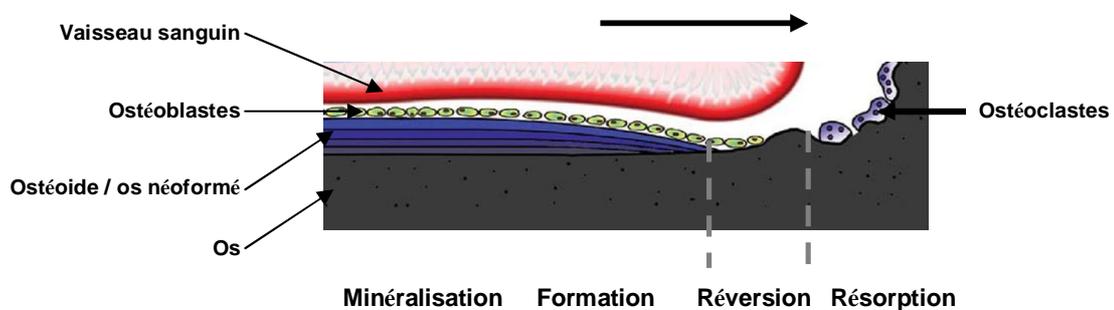


**Figure 19 : Le cycle du remodelage osseux.**  
[Marie et al. 2008]

- Pendant la réversion, la lacune est comblée par des cellules mononucléées incluant des monocytes et des ostéocytes libérés de leur matrice par l'action des ostéoclastes, et par des pré-ostéoblastes recrutés pour initier la formation osseuse [Dempster et al. 2005].

- La formation osseuse se réalise par un processus durant lequel l'ostéoblaste synthétise la matrice organique, l'ostéoïde, puis en régule la minéralisation (voir paragraphe 4.2 **La biominéralisation de la matrice** page 24).

Le remodelage des structures corticales se fait par des unités de remodelage osseux (BRU). Au sein de ces unités, résorption, transition, formation osseuse et minéralisation se succèdent conduisant au remodelage des ostéons. Ce remodelage s'accompagne du remaniement des structures vasculaires présentes dans le canal haversien (Figure 20). [Parfitt 2000]



**Figure 20 : Bone Remodeling Unit (BRU) et mise en place d'un vaisseau sanguin.**

La flèche indique le sens de progression de l'unité de remodelage dans le tissu osseux et au cours de laquelle se succèdent activation des ostéoclastes, résorption du tissu osseux, puis une phase de réversion qui permet de mettre en place l'unité de formation osseuse conduisant à la formation d'une nouvelle matrice (ostéoïde) qui progressivement sera minéralisée. L'avancée de cette unité de remodelage s'accompagne de la progression d'un vaisseau sanguin central dont les cellules endothéliales jouent un rôle dans la régulation du couplage ostéoclaste/ostéoblaste.

D'après [Parfitt 2000; Robling et al. 2006].

Le cycle de remodelage osseux nécessite l'initiation de l'ostéoclastogenèse puis un couplage entre la résorption assurée par les ostéoclastes et l'activité de formation osseuse par l'ostéoblaste. (voir pour revue [Matsuo et al. 2008])

L'initiation repose sur l'activation des ostéoclastes. Deux types cellulaires sont susceptibles d'être impliqués dans cette activation : les cellules bordantes osseuses et les ostéocytes. Toutes deux sont capables de sécréter du RANKL stimulant les précurseurs ostéoclastiques. Le rôle de ces deux types cellulaires a notamment été proposé dans l'initiation d'un remodelage ciblé aux zones où les propriétés mécaniques de l'os sont altérées [Everts et al. 2002; Matsuo et al. 2008].

Le couplage ostéoclaste-ostéoblaste peut être assuré par contact direct entre les ostéoclastes et les ostéoblastes ou via la sécrétion de facteurs paracrines. Les contacts directs peuvent être de type ligand-récepteur, c'est notamment le cas avec l'interaction entre l'EphrinB2 de l'ostéoclaste et EphB4 de l'ostéoblaste qui conduit à l'inhibition des fonctions ostéoclastiques et à l'activation de la différenciation ostéoblastique [Zhao et al. 2006]. La présence de jonctions

communicantes entre les deux types cellulaires, jonctions composées de connexine, permettrait également la différenciation des ostéoblastes et la formation osseuse [Jiang et al. 2007]. L'une des théories postule que le couplage est assuré par les facteurs diffusibles libérés lors de la dégradation de la matrice par les ostéoclastes. Ces facteurs agiraient comme des chimioattractants pour les précurseurs ostéoblastiques. Les facteurs de la matrice susceptibles de jouer ce rôle sont le TGF- $\beta$  [Bonewald et al. 1990; Mundy et al. 1990], l'IGF-I [Mohan et al. 1996], la BMP2 et le PDGF [Fiedler et al. 2002] et le bFGF [Tanaka et al. 2003].

L'ostéoclaste lui-même interviendrait dans la régulation du couplage avec l'ostéoblaste, notamment via son activité de resorption. L'enzyme TRAP agirait comme activateur de la différenciation ostéoblastique [Angel et al. 2000; Karsdal et al. 2005; Martin et al. 2005; Matsuo et al. 2008].

Enfin, les forces mécaniques de pression pourraient réguler le couplage ostéoclastes-ostéoblastes. La diminution de celles-ci activerait les ostéoclastes, alors qu'une augmentation de la pression induirait une activité ostéoblastique [Smit et al. 2002]. Cette théorie serait responsable de l'alignement des ostéons avec les lignes de forces.

La résultante de l'action des ostéoclastes et des ostéoblastes d'une unité de remodelage est appelée la « balance osseuse ». Avec le vieillissement, la balance osseuse à la surface du périoste devient positive, induisant une croissance de la circonférence du cortical. A l'inverse au niveau de l'endoste, les unités de remodelage ont une balance négative conduisant à l'élargissement de la cavité médullaire. Le bilan des balances périostéale et endostéale aboutit à une diminution de l'épaisseur du cortex. De même la balance osseuse à la surface des travées tend à devenir négative avec l'âge, provoquant un rétrécissement des travées fragilisant la structure de l'os.

## 6.2. Le tissu osseux et son rôle dans l'homéostasie

L'homéostasie est assurée par l'interaction coordonnée de plusieurs tissus : l'intestin, site d'absorption des minéraux ; le rein, site d'excrétion et de réabsorption ; et enfin l'os qui est un site de stockage (Tableau 4). L'ajustement et le maintien de l'homéostasie sont médiés par des hormones et des facteurs solubles (PTH, 1-25dihydroxyvitamine D3, FGF23, calcitonine).

	Os (phase minérale)	Compartiment extracellulaire (fluides)	Compartiment intracellulaire (cytosol)
Calcium	>99%	0,10%	Négligeable
Phosphate	85%	0,10%	15%
Magnesium	66%	1%	33%

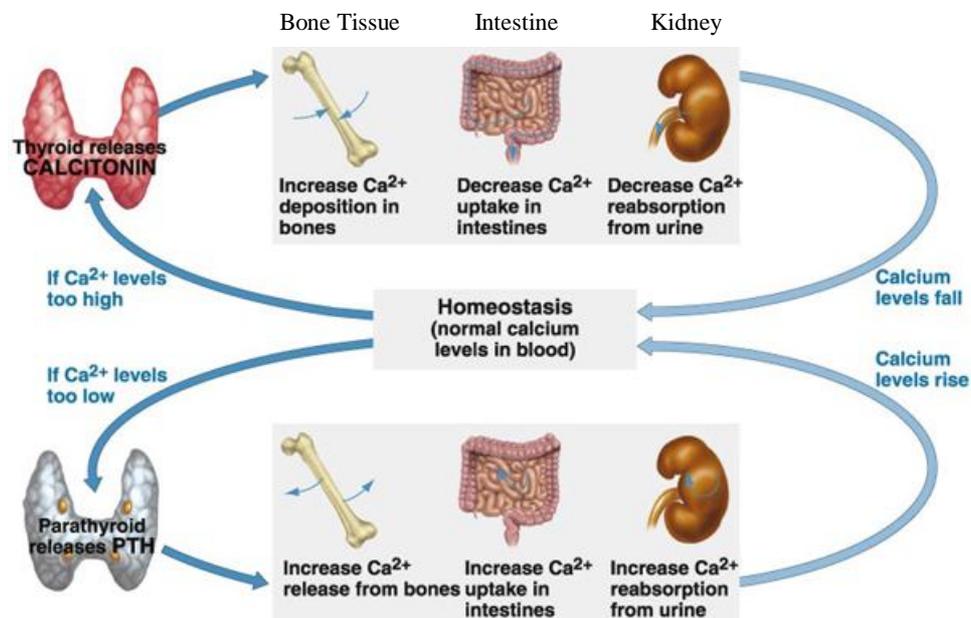
**Tableau 4 : Distribution des ions Calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ), Phosphate ( $\text{PO}_4^{3-}$ ), Magnésium ( $\text{Mg}^{2+}$ ) en pourcentage respectif du contenu total de chaque ion dans l'organisme.**

D'après [Favus et al. 2006].

### 6.2.1. L'homéostasie calcique

La concentration sérique de calcium est contrôlée par des récepteurs-senseurs de calcium présents dans la thyroïde et les parathyroïdes (**Figure 21**). Lors d'une chute de la concentration en calcium, les parathyroïdes sécrètent la PTH. La PTH va agir sur des récepteurs présents à la surface des cellules du tubule rénal et ainsi stimuler une réabsorption du calcium filtré [Friedman et al. 1995]. La PTH va également agir sur les ostéoclastes et activer la résorption osseuse assurant ainsi une libération de calcium du minéral osseux. Au niveau du tubule proximal rénal, elle induit la sécrétion de 1-25, dihydroxyvitamine D3 qui va provoquer une augmentation de l'absorption calcique intestinale [Brenza et al. 1998].

Lors d'une élévation de la concentration sérique en calcium, la thyroïde sécrète de la calcitonine. La calcitonine va agir sur un récepteur couplé aux protéines G présent sur l'ostéoclaste et inhiber la résorption. Au niveau du tubule rénal elle augmente la natriurèse provoquant une hausse de l'excrétion rénale de calcium [Chakraborty et al. 1994].



**Figure 21 : Contrôle de l'homéostasie calcique par la PTH et la calcitonine.**

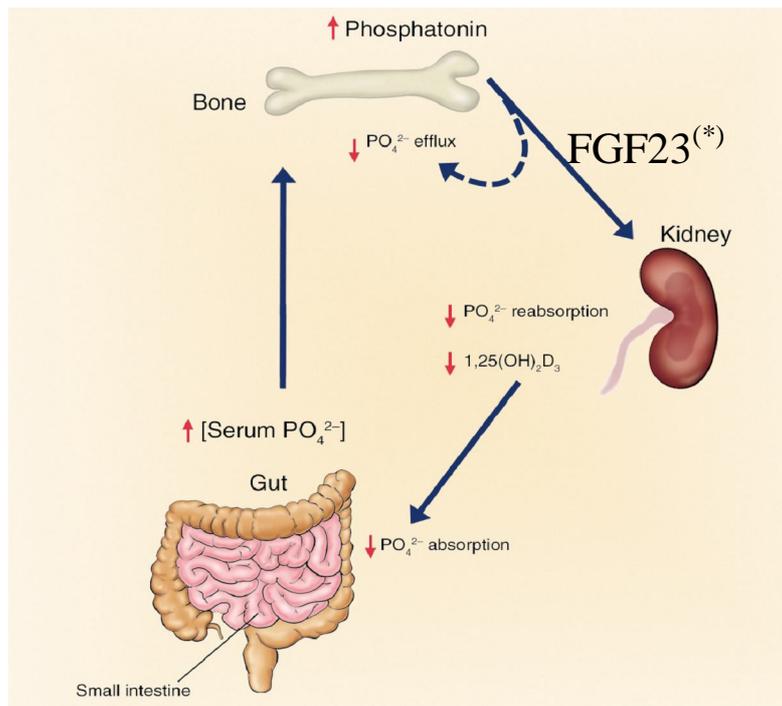
PTH (hormone parathyroïdienne) / calcitonine sont les deux hormones sécrétées pour réguler l'homéostasie calcique. Elles agissent sur trois organes effecteurs : le rein, l'os et l'intestin.

D'après <http://scienceblogs.com/clock/upload/2006/06/calcium%20regulation.jpg>

### 6.2.2. L'homéostasie du phosphate

Le modèle de contrôle de la concentration sérique de phosphate était depuis longtemps basée sur la même boucle de régulation que celle du calcium. Des études cliniques du début des années 2000 ont montré qu'une hypophosphatémie ou une hyperphosphatémie n'était pas corrélée à une variation de la calcémie et de la PTH sérique. Ce sont principalement les travaux de Shimada qui ont montré le rôle d'un nouveau facteur soluble, le FGF23, dans la régulation de la phosphatémie (Figure 22) [Shimada et al. 2001; Shimada et al. 2004; Shimada et al. 2005].

L'administration de FGF23 chez la souris induit une diminution de l'absorption rénale de Pi à cause d'une diminution de l'expression du co-transporteur Na/Pi de type Iia au niveau du tubule rénal. De plus, elle induit une diminution de la synthèse de 1-25(OH)<sub>2</sub>-D<sub>3</sub> résultant en une hypophosphatémie [Shimada et al. 2004]. Par ailleurs, le modèle génétique murin surexprimant FGF23 présente une diminution de 1-25(OH)<sub>2</sub>-D<sub>3</sub> circulante associée à une hypophosphatémie [Bai et al. 2004; Shimada et al. 2004], contrairement aux animaux déficients en FGF23, chez qui il est observé une hausse de 1-25(OH)<sub>2</sub>-D<sub>3</sub> et une hyperphosphatémie sans modification de la calcémie [Shimada et al. 2004; Sitara et al. 2004].



**Figure 22 : Régulation de l'homéostasie du phosphate.**  
D'après [Quarles 2003] et [Shimada 2009]

### 6.3. Les modulateurs du tissu osseux

#### 6.3.1. Les facteurs locaux

Différents facteurs, notamment des facteurs de croissance, présents dans le microenvironnement peuvent moduler l'activité des ostéoblastes et des ostéoclastes.

##### - L'Insulin-like Growth Factor (IGF)

Les IGFs, IGF I et IGF II, sont produits dans de nombreux tissus (musculaire, nerveux, lymphoïdes, endothélial, osseux). Dans l'os, les IGFs sont des régulateurs importants [Baker et al. 1993]. Ils sont synthétisés par les cellules ostéoblastiques. Ils stimulent la prolifération des ostéoblastes et augmentent la synthèse du collagène [Machwate et al. 1994]. Les effets sont modulés par des protéines porteuses (IGF binding protein, IGFBP) qui les séquestrent dans la matrice. Il existe des protéases d'IGFBP capables de les libérer. Au niveau du tissu osseux, c'est l'IGFBP5 qui est exprimée [Richman et al. 1999]. IGF-I semble jouer un rôle

dans la réparation osseuse, car après fracture son expression est augmentée dans l'os néoformé [Wildemann et al. 2004].

- Le Transforming Growth Factor : TGF- $\beta$

Le TGF- $\beta$  est un facteur local fondamental dans le contrôle de l'ostéogenèse. Il stimule la formation osseuse, la prolifération des pré-ostéoblastes ainsi que la production de collagène de type 1 et de l'ostéopontine. Il inhibe la dégradation de la matrice. Il contrôle également la différenciation ostéoclastique de façon indirecte en augmentant la production d'OPG par les cellules stromales et les ostéoblastes [Suda et al. 1999]. Enfin, il joue également un rôle au cours de la réparation osseuse [Bolander 1992; Beck et al. 1993].

- Les Bone Morphogenetic Proteins (BMPs)

Les BMPs appartiennent à la famille du TGF- $\beta$ . Elles sont synthétisées par les ostéoblastes différenciés et agissent de façon autocrine sur leur fonction [Hughes et al. 1995]. Elles induisent la différenciation des cellules souches mésenchymateuses vers le lignage ostéochondral [Marie 2000]. Ce sont des protéines ostéoinductives, elles activent l'expression des marqueurs ostéoblastiques RUNX2, PAL, OCN, et du collagène. Par ailleurs, elles jouent un rôle important dans l'initiation de la réponse cellulaire lors de la cicatrisation du tissu osseux (notamment la BMP2).

- Le Fibroblast Growth Factor (FGF)

Les facteurs de croissance de type FGFs forment une famille de polypeptides d'une vingtaine de membres [Mirams et al. 2004]. Certains d'entre eux agissent au niveau osseux (FGF2, 4, 18 et 9). Il existe quatre récepteurs de haute affinité nommés FGFR. Dans l'os, on retrouve les isoformes FGFR1, 2 et 3. Comme de nombreux facteurs de croissance, les FGFs sont piégés dans la matrice extracellulaire. Ils agissent essentiellement sur la lignée ostéoblastique en contrôlant la prolifération et l'apoptose des ostéoblastes. [Ornitz et al. 2002; Ornitz 2005]

### 6.3.2. Les facteurs systémiques

Le tissu osseux est sensible à de nombreuses hormones. Certaines d'entre elles participent à la régulation de l'homéostasie et agissent sur l'os afin de moduler la libération et le stockage des ions dans le minéral via la résorption ou la formation osseuse. C'est le cas de la PTH, de la calcitonine et du calcitriol (ou 1-25(OH)<sub>2</sub>-D<sub>3</sub>, vitamine D<sub>3</sub>).

La calcitonine est un peptide de 32 acides aminés produit par les cellules C (para folliculaires) de la glande thyroïde. Cette hormone est hypocalcémiante et hypophosphatémiante. Elle agit directement au niveau des ostéoclastes qui expriment son récepteur (Calcitonin Receptor, CTR) en les inhibant (voir pour revue [Inzerillo et al. 2002; Zaidi et al. 2002]). Son rôle dans la régulation de la résorption reste discuté. En effet, *in vivo* la délétion du gène de la calcitonine ou de son récepteur n'entraîne pas de diminution de la masse osseuse comme attendu mais une augmentation [Hoff et al. 2002; Dacquin et al. 2004].

Le calcitriol ou 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> est le métabolite actif de la vitamine D. Cette vitamine est d'origine alimentaire et endogène. Elle est produite au niveau cutané sous l'action des ultraviolets, et nécessite pour être active deux hydroxylations successives l'une par le foie, l'autre par le rein. La sécrétion endogène de 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> est augmentée par l'action de la

PTH, et s'autorégule par rétrocontrôle négatif. Une hypercalcémie induit l'augmentation de sa sécrétion et inhibe l'hydroxylase rénale afin d'en contrôler la concentration sérique. En plus de son rôle dans l'homéostasie osseuse,  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  induit la différenciation des ostéoclastes dans un modèle de co-culture ostéoblastes-ostéoclastes. Cet effet est indirect, il passe par la sécrétion de ligand RANKL par l'ostéoblaste [Takahashi et al. 1988; Suda et al. 1999]. *In vivo*, l'injection de doses importantes de  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  augmente la résorption osseuse [Suda et al. 2003]. La délétion chez la souris du gène codant pour le récepteur nucléaire de la vitamine D (VDR) induit un retard de croissance après sevrage et la mort des animaux par hypocalcémie [Li et al. 1997; Yoshizawa et al. 1997].

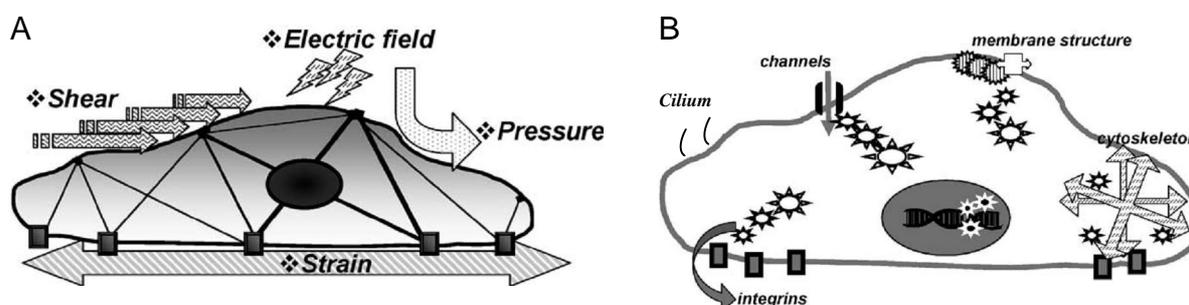
L'hormone parathyroïdienne (PTH) est une hormone peptidique de 84 acides aminés sécrétée par les glandes parathyroïdiennes. La sécrétion de PTH est principalement modulée par la concentration sérique en calcium via un récepteur au calcium (CaSR) [Tfelt-Hansen et al. 2005]. La PTH agit sur deux organes cibles, le rein et l'os, induisant une hypercalcémie et une hypophosphatémie. Les effets de la PTH dépendent du type même de la stimulation : en continu, elle favorise la résorption osseuse, alors qu'appliquée de façon intermittente elle induit un effet anabolique net sur l'os [Tam et al. 1982; Horwitz et al. 2005]. Au niveau de l'ostéoblaste, elle augmente la formation de nodules minéralisés, la prolifération et favorise la transition des cellules bordantes quiescentes vers des cellules osseuses actives. De plus, elle permet la production de RANKL par les ostéoblastes et certaines cellules stromales de la moelle, favorisant ainsi l'ostéoclastogénèse. Enfin, administrée de façon quotidienne, la PTH favorise la formation du cal osseux lors d'une fracture par stimulation de l'ossification endochondrale [Alkhiary et al. 2005]. (voir pour revue [Silve 2009])

Le cortisol est un glucocorticoïde sécrété par la glande surrénale. Les cellules osseuses expriment son récepteur [Chen et al. 1977]. Toutefois, les résultats obtenus *in vitro* varient en fonction de la dose et du modèle cellulaire. A dose physiologique, le cortisol induirait la différenciation des ostéoblastes et la formation osseuse. A l'inverse de fortes concentrations, il serait un inhibiteur de l'activité ostéoblastique [Chen et al. 1977; Wong 1979]. *In vivo*, le traitement prolongé et à forte dose de cortisol, ainsi que de glucocorticoïdes, entraîne une ostéoporose [Altman et al. 1992; Turner et al. 1995]. (voir pour revue [Orcel 2009])

Les cellules osseuses expriment également les récepteurs  $\alpha$  et  $\beta$  aux oestrogènes. Les oestrogènes jouent un rôle prépondérant dans le contrôle de la croissance. Ils initient la poussée de croissance observée au début de la puberté, assurent la maturation du squelette osseux et enfin sont responsables de l'arrêt de croissance à la fin de la puberté. A l'âge adulte, la principale fonction des oestrogènes est de préserver le capital osseux en contrôlant le remodelage osseux. Ainsi, les oestrogènes favorisent la différenciation en ostéoblastes plutôt qu'en adipocytes des précurseurs cellulaires [Okazaki et al. 2002]. *In vitro*, ils favorisent la prolifération des ostéoblastes [Fujita et al. 2002]. Ils tendent à avoir un effet anabolique sur les ostéoblastes isolés, et inhibent l'apoptose des ostéocytes [Tomkinson et al. 1997] et des ostéoblastes [Gohel et al. 1999]. *In vivo*, cependant, les traitements aux oestrogènes sont généralement associés à une diminution du nombre d'ostéoblastes et de leurs activités [Vedi et al. 1996]. Cet effet serait lié au couplage de l'activité des ostéoblastes à celles des ostéoclastes qui par conséquent se retrouve également réduite et induit une diminution de la résorption osseuse. Les oestrogènes ont un effet majeur sur les ostéoclastes [Kato 2009]. Ils inhibent leur formation [Srivastava et al. 2001], protègent de la perte osseuse induite par l'ovariectomie [Most et al. 1995; Nakamura et al. 2007]. En l'absence d'oestrogènes, l'activité des ostéoclastes n'est plus inhibée conduisant à une perte osseuse [Jilka et al. 1992], comme c'est le cas chez la femme ménopausée.

### 6.3.3. Les forces mécaniques

Au sein du tissu osseux les cellules subissent l'action des forces de tension, de compression et des contraintes de cisaillement dues au déplacement des fluides lors de la déformation du tissu [Robling et al. 2006; Rubin et al. 2006]. Les cellules osseuses sont capables de percevoir ces différents stimuli grâce à la présence de mécanosenseurs exprimés au niveau de la membrane plasmique (Figure 23).



**Figure 23 : Forces mécaniques dans l'environnement cellulaire et systèmes mécanosenseurs des ostéoblastes.**

(A) Le tissu osseux peut être soumis à plusieurs types de stimulations mécaniques : des forces de tension (strain), des forces de compression (pressure), des forces créées par des champs électriques (electric field) ou des forces de cisaillement (shear). (B) Systèmes mécano senseurs de l'ostéoblaste.  
[Rubin et al. 2006; Malone et al. 2007; Malone et al. 2007; Whitfield 2008]

La réponse du tissu osseux aux forces mécaniques est particulièrement bien décrite dans deux situations opposées :

- en cas d'absence de stimulation mécanique, comme dans le modèle de suspension des rongeurs par la queue, une diminution de la masse osseuse et du BV/TV (Bone Volume / Tissue Volume) sont observées au niveau du squelette des membres inférieurs [Ishijima et al. 2006; Malaval et al. 2008].
- chez les sportifs de haut niveau, il a été décrit une augmentation de la masse osseuse et notamment de l'épaisseur corticale de l'humérus chez le joueur de tennis [Haapasalo et al. 2000; Vico et al. 2009]. Une augmentation de la formation osseuse est provoquée par des stimulations mécaniques dans des modèles de rongeurs.

Les forces mécaniques conditionnent la mise en place de la réparation du tissu osseux en orientant celle-ci vers un mécanisme d'ossification endochondrale ou intramembranaire (voir chapitre II-3. Les forces mécaniques et leur rôle dans le contrôle de la réparation osseuse).

Il apparaît clairement que la connaissance de la structure, de la composition, de la formation et de la physiologie du tissu osseux est un pré-requis à l'étude et à la compréhension des mécanismes impliqués dans sa réparation. En effet, les cellules, les protéines matricielles et les facteurs régulateurs impliqués dans la physiologie de ce tissu sont également responsables de sa régénération suite à une fracture ou à une lésion.

## II. La réparation naturelle du tissu osseux

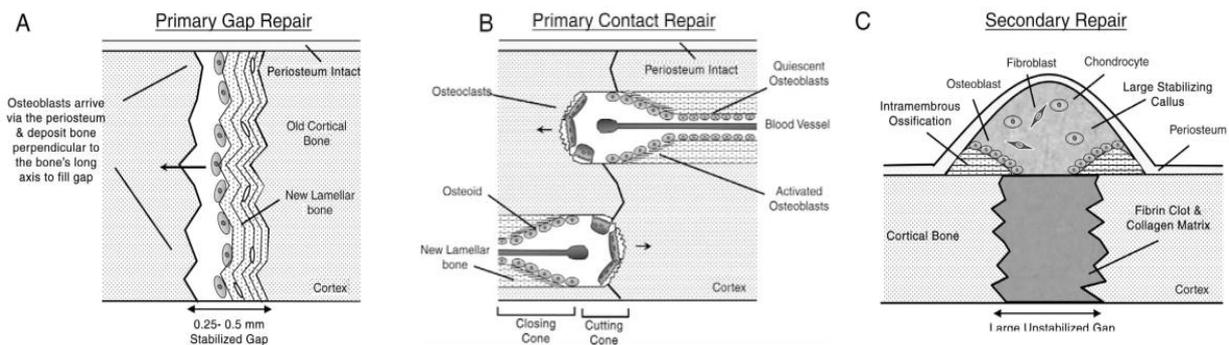
La cicatrisation constitue l'ensemble des phénomènes cellulaires, moléculaires, physiologiques et biochimiques grâce auxquels l'organisme répare les lésions accidentelles survenues dans un tissu. Là où de nombreux tissus mettent en place un tissu cicatriciel, généralement de type fibreux, le tissu osseux est capable de restaurer les propriétés géométriques, physiques et fonctionnelles de la zone traumatisée. On parle alors de régénération ou de réparation osseuse. [Einhorn 1998; Dimitriou et al. 2005; Shapiro 2008]

### 1. Mécanisme général de la réparation osseuse

#### 1.1. Les différents types de lésions osseuses et modes de réparation

Shapiro propose une classification des lésions osseuses et de leur réparation en fonction de la stabilité de la lésion, de la taille du défaut créé et de l'origine des cellules réparatrices [Shapiro 2008].

- La réparation endochondrale, ou réparation par formation d'un cal, est réalisée suite au recrutement de cellules de la couche interne du périoste et de la moelle osseuse. Elle conduit à la formation de cartilage puis d'os tissé et lamellaire dans un espace inter-fragmentaire, large et mobile (**Figure 24C**).



**Figure 24 : Réparation osseuse primaire versus secondaire.**

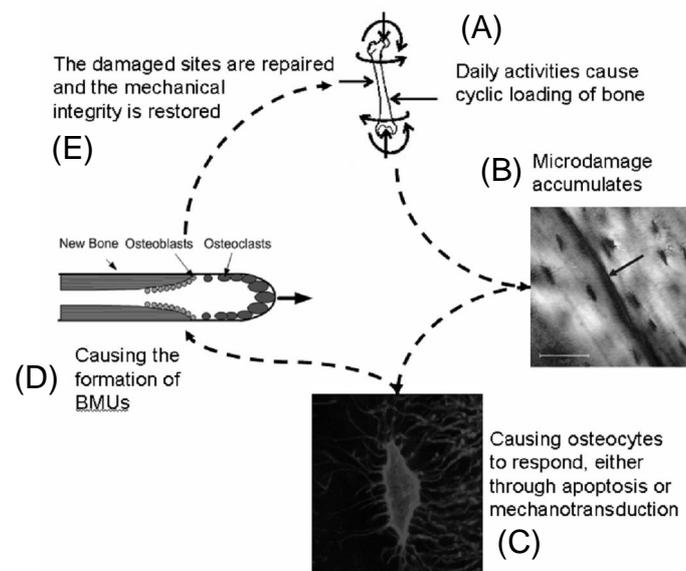
- (A) Quand une petite fracture osseuse survient et que l'os reste stabilisé, les ostéoblastes déposent de l'os perpendiculairement à l'axe de l'os, remplissant le trou et servant de support au remodelage.
- (B) Dans le modèle où les fragments osseux sont en contact direct, aucun cal n'est formé. Des cônes identiques aux unités de remodelage se forment pour résorber l'os endommagé et réparer la lésion.
- (C) Les fractures non stabilisées sont réparées par ossification endochondrale.
- [Stroncek et al. 2007]

- La réparation osseuse primaire ou de contact direct, fait intervenir des ostéoclastes résorbant les zones osseuses nécrotiques de chaque côté de la lésion. Les ostéoblastes du système haversien produiront directement un os lamellaire parallèle à l'axe de l'os. Ce mode de réparation se caractérise par l'absence de phase cartilagineuse et de remodelage osseux. Il se réalise dans un environnement sans espace inter-fragmentaire et stable (**Figure 24B**).

Ce mode de réparation est proche de celui mis en place pour la réparation des micro-dommages osseux. Un micro dommage osseux est une micro fracture intra osseuse de quelques centaines de micromètre. Il peut survenir dans l'os cortical comme dans l'os

trabéculaire. L'accumulation de micro dommages osseux fragilise l'os et augmente le risque de fracture.

L'initiation de la réparation de ce type de lésion reste encore mal connue. Les hypothèses proposées sont basées sur la perception des changements mécaniques engendrés par le dommage soit par les cellules du canal haversien, soit par les cellules bordantes soit par l'ostéocyte [Everts et al. 2002; Hazenberg et al. 2009; Heino et al. 2009]. Dans les deux cas, la réparation se fait par la mise en place localement d'une unité de remodelage osseux (**Figure 25**). Les travaux de Hazenberg suggèrent que l'ostéocyte, en réponse au changement des contraintes mécaniques, sécrète du RANKL permettant l'activation des ostéoclastes. [Donahue et al. 2006; Hazenberg et al. 2009]



**Figure 25 : Régulation des micro-fractures (micro dommage).**

(A) Les activités quotidiennes causent des forces de tension, de torsion et de compression. (B) Accumulation de micro dommages osseux. (C) Le réseau d'ostéocytes localisés dans la matrice osseuse sont stimulés par la modification des forces mécaniques suite aux dommages. (D) Formation locale d'une unité de remodelage osseux. (E) Le micro dommage est réparé.

[Hazenberg et al. 2009]

- La réparation dite « réparation osseuse directe » (direct bone repair, gap repair) ne passe pas par une étape intermédiaire cartilagineuse. Les cellules ostéoprogénitrices provenant de la moelle osseuse produisent un os primaire, perpendiculaire à l'axe de la pièce osseuse, qui sera remodelé pour donner un os mature lamellaire. Ce mode de réparation survient dans le cas de lésions créant un espace de plus de 0,1 mm, dans un environnement très stable [Perren 1979; Shapiro 1988] (**Figure 24A**).

La distraction ostéogénique, proche de la réparation osseuse directe, fait intervenir les cellules mésenchymateuses de la couche interne du périoste, de l'endoste et de la moelle osseuse. Ces cellules différenciées en ostéoblastes produiront un os primaire (os tissé) dans l'espace créé par l'écartement des bords du défaut. Cet os sera secondairement remodelé en os lamellaire. Cette réparation se fait dans un environnement sans contraintes mécaniques (**Figure 24A**).

D'une façon plus concise, les lésions osseuses peuvent être classées en trois grandes catégories. Les fractures, formées spontanément suite à une chute par exemple, dans un environnement non stabilisé où les forces mécaniques sont fortes, feront appel à une réparation endochondrale. Lorsqu'elles seront stabilisées, la réparation osseuse directe sera favorisée. Enfin, les défauts ou défauts formés lors de chirurgie (exérèse de tumeur, remplacement de ligaments, prélèvement de greffon en vue d'une greffe osseuse autologue, ...) se réparent eux aussi par réparation osseuse dite directe.

Histologiquement, deux mécanismes de réparation sont distinguables :

- l'ossification primaire dans laquelle la lésion est rapidement comblée par formation d'un os primaire formé par ossification intramembranaire et qui sera par la suite remodelé ;
- la réparation dite secondaire dans laquelle ossifications endochondrale et intramembranaire sont combinées.

Quel que soit le type de lésion et le mode de réparation, le processus de réparation se fait selon une séquence d'évènements cellulaires et moléculaires bien définis plus ou moins intriqués.

## 1.2. Les phases de la réparation osseuse (Tableau 5)

Day 1	Haematoma formation, inflammation Recruitment of mesenchymal cells Osteogenic differentiation of MSCs from bone marrow	Cytokines: IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ released by inflammatory cells PDGF, TGF-beta released from degranulating platelets BMP-2 expression and restricted to day 1 expression of GDF-8
Day 3	MSCs proliferation begins Proliferation and differentiation of preosteoblasts and osteoblasts in regions of intramembranous ossification Angiogenesis begins	Decline of cytokines levels Expression of TGF- $\beta$ 2, - $\beta$ 3, GDF-10, BMP-5, -6 Angiopoietin-1 is induced
Day 7	Peak of cell proliferation in intramembranous ossification between days 7 and 10 Chondrogenesis and endochondral ossification begins (days 9–14 maturation of chondrocytes)	Peak of TGF- $\beta$ 2 and - $\beta$ 3 expression Expression of GDF-5 and probably GDF-1
Day 14	Cessation of cell proliferation in intramembranous ossification, but osteoblastic activity continues Mineralization of the soft callus, cartilage resorption, and woven bone formation Neo-angiogenesis which infiltrates along new mesenchymal cells Phase of most active osteogenesis until day 21	Decreased levels of expression for TGF- $\beta$ 2, GDF-5, and probably GDF-1 Expression of BMP-3, -4, -7, and -8 VEGFs expression Second increase of IL-1 and TNF- $\alpha$ which continues during bone remodelling
Day 21	Woven bone remodelled and subsequently replaced by lamellar bone	Decreased expression of TGF- $\beta$ 1 and TGF- $\beta$ 3, GDF-10, and BMPs (2–8)

**Tableau 5: Cinétique des événements cellulaires et expression des molécules de signalisation durant la réparation osseuse chez la souris.**

[Dimitriou et al. 2005]

## - L'hémostase et la phase inflammatoire

Le tissu osseux étant richement vascularisé, une lésion va induire la rupture des vaisseaux périostés, intracorticaux et médullaires nécessitant ainsi une phase d'hémostase. Celle-ci va produire un clou hémostatique puis un tissu de granulation qui va servir de support à la formation du cal [Brighton 1984], la fonction de ce cal étant de stabiliser les fragments osseux.

Au sein du caillot les plaquettes activées libèrent des cytokines et des facteurs de croissance contenus dans leurs granules  $\alpha$  (PDGF, TGF- $\beta$ ). Ces facteurs ont une activité chimioattractante pour les macrophages, monocytes et polynucléaires. Ces cellules de l'immunité innée jouent également un rôle important dans le nettoyage de la plaie et dans la sécrétion de nombreux facteurs (prostaglandines, IL1 et 6, TNF  $\beta$ , interféron- $\gamma$ , ostéoprotégérine, RANK-L) [Bolander 1992].

## - La vascularisation

La réparation naturelle d'une lésion osseuse nécessite la coordination des mécanismes moléculaires qui régulent le remodelage de la matrice extracellulaire et la pénétration des vaisseaux.

Il est nécessaire de distinguer que dans l'ossification endochondrale, la formation des vaisseaux se fait après la formation du cartilage, alors qu'elle apparaît avant le cal dur dans l'ossification intramembranaire.

La vascularisation au cours de la réparation est stimulée par l'activation de deux voies, celle dépendante du VEGF (Vascular endothelial Growth Factor) et celle de l'angiopoïétine [Pacicca et al. 2003]. Par ailleurs, la progression des vaisseaux au sein de la matrice est étroitement liée à l'action spécifique de métalloprotéinases. [Gerber et al. 1999; Street et al. 2002; Leach et al. 2006; Page-McCaw et al. 2007]

La formation des vaisseaux permet la mise en place du cal dur en participant à l'acheminement de progéniteurs ostéoblastiques. Par ailleurs la communication entre les cellules endothéliales et les ostéoblastes est importante pour la régulation de la différenciation des ostéoblastes et la formation osseuse [Grellier 2008]. [Vu et al. 1998; Ferguson et al. 1999; Yamagiwa et al. 1999; Zhou et al. 2000; Carano et al. 2003; Colnot et al. 2003; Lehmann et al. 2005; Behonick et al. 2007]

## - Formation d'un cal mou puis d'un cal dur

Sous l'action des facteurs solubles libérés au cours de la phase inflammatoire (TGF- $\beta$  et PDGF), les cellules mésenchymateuses non différenciées se condensent, prolifèrent et forment un cal mou. Ces cellules ont différentes origines (voir paragraphe 2 page 46).

Dans un modèle de réparation primaire, au sein du cal fibreux, les cellules prolifèrent et se différencient rapidement en ostéoblastes avec un pic de production entre 7 et 10 jours. A partir d'environ 10 jours, les cellules cessent de proliférer, le cal se convertit en cal dur avec formation d'os primaire minéralisé par ossification intramembranaire.

Dans un modèle endochondral, la prolifération cellulaire est plus longue, conduisant à un cal cartilagineux de grande taille. L'ossification endochondrale se met en place autour du 9<sup>ème</sup> jour avec maturation des chondrocytes. Le cartilage est peu à peu remplacé par de l'os tissé dès le 14<sup>ème</sup> jour après la fracture.

D'une façon générale, la formation de l'os primaire se poursuit jusqu'au 21<sup>ème</sup> jour après la lésion.

## - Remodelage osseux

La dernière phase de la réparation est le remodelage de l'os primaire en un os cortical ou trabéculaire lamellaire. Cette phase est aussi appelée formation osseuse secondaire. Ce processus de remodelage est conduit par une résorption osseuse, accomplie par les ostéoclastes, suivie d'une formation osseuse par les ostéoblastes. Ce cycle est identique à celui décrit au cours de l'ostéogénèse.

### **1.3. Réparation et embryogenèse**

Les mécanismes sous-jacents de cette réparation tissulaire présentent de fortes similarités avec les mécanismes d'ossification endochondrale et intramembranaire mis en place au cours de l'ontogénèse du tissu osseux [Ferguson et al. 1999; Cullinane et al. 2002; Gerstenfeld et al. 2003; Shapiro 2008]. Pour certains auteurs, les mécanismes mis en jeu au cours de la réparation dépendent de la ré-induction de voies moléculaires impliquées au cours du développement [Sandberg et al. 1993; Iwasaki et al. 1997; Vortkamp et al. 1998]. Cependant, deux points majeurs distinguent ces deux mécanismes.

La formation osseuse, qu'elle soit ontogénique ou réparatrice, débute par le recrutement, la condensation puis la différenciation de cellules mésenchymateuses [Hall et al. 1992; Hiltunen et al. 1993]. En fonction des facteurs environnementaux, solubles, physiques ou mécaniques, ces cellules vont s'orienter vers la chondrogenèse, l'ossification endochondrale ou l'ostéogénèse. Au sein du bourgeon embryonnaire, ces mécanismes sont guidés par des gradients de morphogènes tels que les BMPs, le TGF- $\beta$ , Wnt [Gerstenfeld et al. 2003]. Dans un environnement fracturaire, l'initiation de l'ossification fait suite à une phase hémostatique et inflammatoire. L'inflammation et l'hémostase libèrent des facteurs de croissance, de nombreuses cytokines et chimiokines tels que l'IL-1, l'IL-6, des prostaglandines (PG E2), du TNF  $\alpha$ . L'ensemble de ces facteurs constitue un environnement biochimique différent de celui présent dans le bourgeon osseux embryonnaire [Bolander 1992; Bruder et al. 1994].

La seconde différence concerne l'environnement mécanique. En effet, l'ostéogénèse embryonnaire se déroule dans un tissu mou, non minéralisé et relativement peu soumis aux contraintes mécaniques. Au contraire, les mécanismes de réparation osseuse se déroulent, par définition au sein d'une lésion du tissu osseux adulte. Ce tissu adulte peut être l'objet de différentes forces mécaniques, forces qui ont une forte influence sur le processus de réparation (paragraphe 3 en page 49) [Henderson et al. 2002].

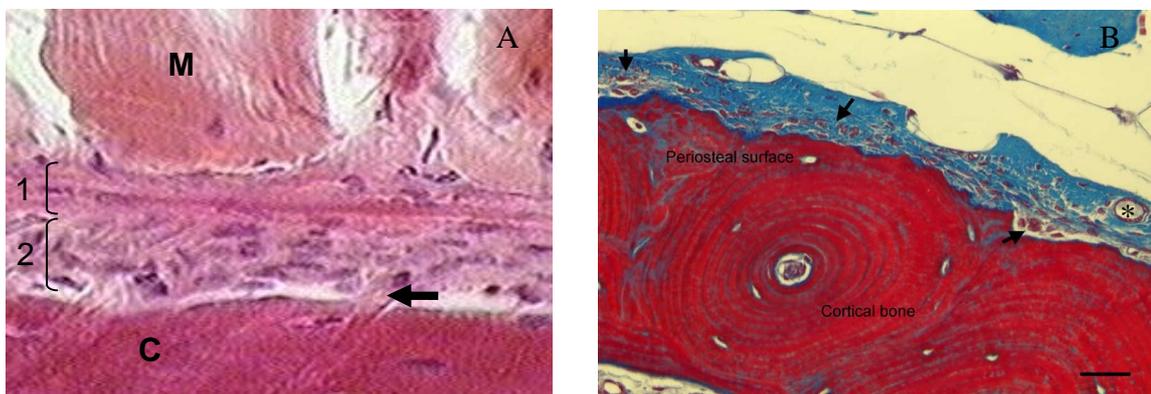
## **2. Les cellules ostéoprogénitrices**

Pour Phillips, quatre zones contribuent à la réparation d'une fracture osseuse : la cavité médullaire, la zone intracorticale, le périoste et les tissus mous environnants. Les deux premières seraient responsables de la mise en place d'un cal mou, puis d'un os par ossification endochondrale. Le périoste et les tissus mous environnants seraient à l'origine du cal dur et de l'ossification intramembranaire. [Phillips 2005]

Shapiro précise quant à lui cinq sources possibles de cellules ostéoprogénitrices [Shapiro 2008] :

- Les cellules de la couche interne du périoste
- Les ostéoprogéniteurs associés aux vaisseaux du système haversien de l'os cortical
- Les cellules bordantes de l'endoste
- Les cellules mésenchymateuses non différenciées de la moelle osseuse
- Les cellules non différenciées des tissus mous et des tissus conjonctifs environnants
- Le périoste

Le périoste est un tissu conjonctif ancré à l'os par les fibres de Sharpey (Figure 26). Il se compose d'une couche fibreuse externe contenant des fibroblastes et les fibres de Sharpey et d'une couche interne (dite couche cambiale) regroupant des nerfs, des capillaires, des ostéoblastes et des cellules souches mésenchymateuses. Le périoste est un tissu ostéogénique richement vascularisé dont les capillaires et artérioles sont directement en contact avec le système vasculaire osseux. [Allen et al. 2004; Zhang et al. 2008; Schindeler et al. 2009]



**Figure 26 : Le périoste.**

(A) Couche externe (1) et interne (2) du périoste ; tissu musculaire (M) ; os cortical (C) ; la flèche indique une fibre de Sharpey. Coloration Hématoxyline Eosine Safran. Copyright : Paul B. Bell, Jr. & Barbara Safiejko-Mrocza (The University of Oklahoma). (B) Les flèches indiquent les cellules du cambium (couche interne du périoste), l'astérisque un capillaire sanguin. Coupe de tissu osseux humain, coloration trichrome de Masson. La barre représente 25µm. [Allen et al. 2004]

Le périoste est clairement une source potentielle de cellules ostéoprogénitrices pour la réparation osseuse. Il est connu que le retrait du périoste résulte en une diminution de la capacité de l'os à se réparer. Ceci a été démontré dans un modèle d'ostéotomie chez le lapin, dans laquelle le périoste a été supprimé aboutissant à l'absence de réparation de la lésion [Oni et al. 1992]. De façon similaire, [Ozaki et al. 2000] démontre que l'ablation du périoste dans un modèle de fracture du tibia chez le rat provoque la diminution de la taille du cal.

Des expériences de transplantation de cellules de moelle osseuse de souris ROSA26, exprimant la  $\beta$ -galactosidase, ont permis de déterminer l'origine des cellules ostéoprogénitrices impliquées dans la réparation. Ainsi, les travaux de Colnot et al tendent à montrer qu'au cours de la réparation d'une fracture par ossification endochondrale, les ostéochondroprogéniteurs ne sont pas issus de la moelle osseuse, suggérant une origine périostée [Colnot et al. 2006; Colnot 2009].

L'ensemble des données recueillies mettent en avant la richesse du périoste en cellules ostéogéniques pour l'ingénierie tissulaire et la réparation osseuse [Hutmacher et al. 2003].

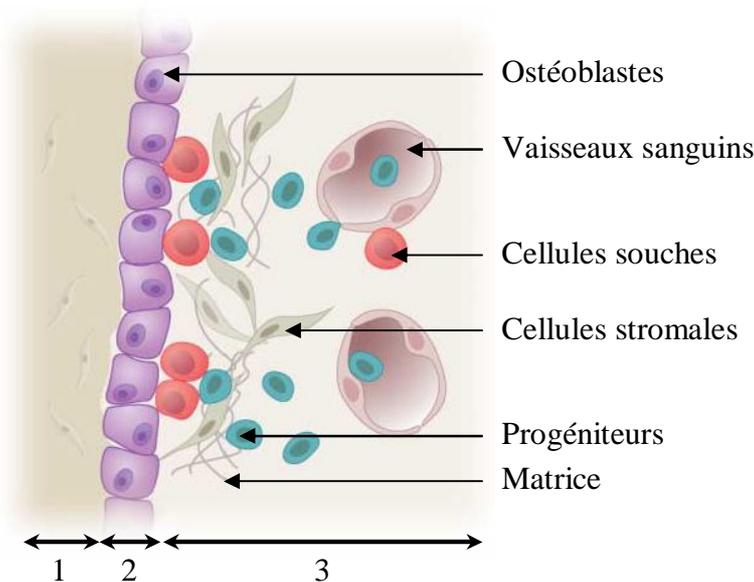
- Les cellules bordantes endostéales et les ostéoprogéniteurs du système vasculaire haversien

Le système haversien ou ostéon, propre à l'architecture du tissu osseux humain, est l'unité structurale de base de l'os cortical. Il se compose de lamelles concentriques de matrice minéralisée, disposées autour d'un canal central contenant le réseau sanguin et des nerfs. Au sein de la matrice sont disposés de façon régulière des ostéocytes. La cavité du canal haversien, comme l'os trabéculaire ou cortical, est recouverte par une couche de cellules bordantes. D'un point de vue topographique, les canaux haversiens sont isolés de la moelle, du périoste et de l'endoste. Par conséquent, ils contiennent leurs propres progéniteurs ostéoblastiques, qui sont recrutés lors du remodelage de l'os cortical.

Le rôle des cellules bordantes dans la réponse du tissu osseux aux situations pathologiques est connu dans le cas de charge et post charge. Ces cellules interviennent également dans la réparation d'une fracture osseuse et d'un défaut, comme le montrent les travaux de greffe osseuse [Colnot 2009].

- Les cellules mésenchymateuses de la moelle osseuse

La moelle est connue pour être un réservoir de cellules souches mésenchymateuses à l'origine de différentes lignées cellulaires, dont les chondrocytes et les ostéoblastes (Figure 27). Des études tendent à prouver l'implication de cette niche cellulaire dans la réparation osseuse [Takagi et al. 1982; Feeley et al. 2006].



**Figure 27 : Niche cellulaire de la moelle osseuse.**  
Os cortical (1), endoste (2), moelle osseuse (3). [Moore et al. 2006]

Les travaux de Colnot et al. démontrent que les cellules ostéoblastiques participant à l'ossification intramembranaire, survenant lors de la réparation d'une lésion osseuse stabilisée sont en partie d'origine médullaire [Colnot et al. 2006; Colnot 2008; Colnot 2009].

Par ailleurs, des études *in vitro* ont montré que les cellules de la moelle osseuse sont sensibles à l'action des facteurs solubles libérés au cours du processus de cicatrisation. Enfin, l'utilisation de ces cellules en ingénierie osseuse permet d'améliorer la réparation d'une lésion

osseuse [Cui et al. 2006; Feeley et al. 2006; Tseng et al. 2008] et le guidage de la réparation par un biomatériau augmente les capacités ostéoinductive et ostéointégrative de ce dernier [He et al. 2007; Ben-Ari et al. 2009].

- Les cellules des tissus mous environnants

L'os est entouré de tissus mous. Le tibia, par exemple, est recouvert sur sa face antérieure majoritairement par du tissu cutané et sur sa face postérieure par du tissu musculaire.

Harry et al. ont montré que l'isolement des tissus mous de l'os fracturé, grâce à un film de PTFE (PolyTétraFluoroÉthylène), entraîne une altération de la réparation suggérant un rôle du tissu musculaire et cutané dans le processus de réparation osseuse [Harry et al. 2008]. *In vitro*, le potentiel ostéogénique des cellules du tissu musculaire a été démontré par leur réponse aux BMP [Musgrave et al. 2001; Musgrave et al. 2002; Schindeler et al. 2009].

### 3. Les forces mécaniques et leur rôle dans le contrôle de la réparation osseuse

Le microenvironnement et les contraintes mécaniques s'appliquant au niveau de la zone de lésion conditionnent le processus de réparation [McKibbin 1978; Carano et al. 2003; Cullinane et al. 2003; Dimitriou et al. 2005; Giannoudis et al. 2007; Morgan et al. 2008; Shapiro 2008].

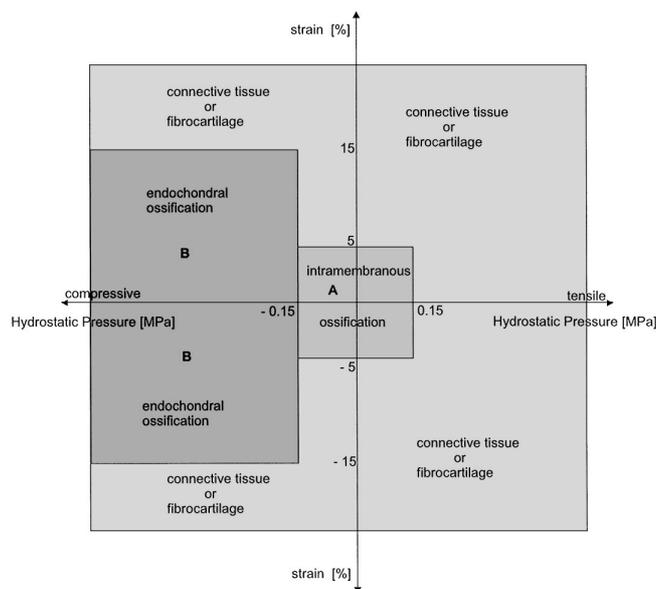
L'os peut être soumis à différentes forces mécaniques :

- la compression (dénominations anglaises : stress, hydrostatic pressure),
- l'étirement (dénominations anglaises : strain, tensile force, tension),
- le cisaillement (dénominations anglaises : shear) lié au mouvement des liquides extracellulaires lors de compressions par exemple.

Il existe actuellement un consensus indiquant que les forces d'étirement induisent l'ossification intramembranaire, la compression induit l'activation des chondrocytes, avec pour une pression hydrostatique constante l'induction de cartilage et pour des compressions intermittentes la mise en place d'une ossification endochondrale. Enfin une forte contrainte de cisaillement conduit à la formation de tissu fibreux [Carter et al. 1998]. Whitfield propose que le switch entre ostéoblastogenèse et chondrogenèse implique la détection des forces de cisaillement par une structure ciliaire présente à la surface de la membrane plasmique des cellules mésenchymateuses [Whitfield 2008].

Ces observations ont été réalisées avec application d'un type de force dans des systèmes uniaxiaux. Cependant, au cours de la réparation plusieurs types de forces s'appliquent simultanément et dans plusieurs directions. Ainsi l'étude de Pauwels montre qu'une combinaison entre le cisaillement et la compression aboutit à la formation de fibrocartilage [Pauwels 1976].

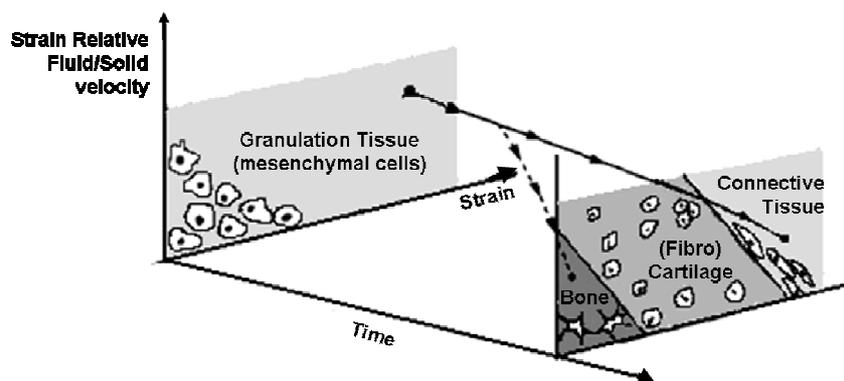
Claes et al. proposent une corrélation entre la mesure de forces mécaniques et les différents tissus présents au cours de la réparation osseuse (**Figure 28**) [Claes et al. 1999]. Ainsi l'augmentation des forces de compression favoriserait le développement de l'ossification endochondrale au détriment de l'ossification intramembranaire.



**Figure 28 : Modèle de corrélation entre les forces mécaniques mesurées et le type de tissu au cours de la réparation d'une fracture osseuse.**

Force de compression (stress, hydrostatic pressure) ; force d'étirement (strain, tensile force).  
[Claes et al. 1999]

Il faut également considérer le tissu comme un élément mixte solide – fluide, la phase solide étant la matrice et la phase fluide représentant les cellules dont le contact est assuré par des jonctions communicantes. Les forces s'appliquant dans un système mixte conditionnent également la réparation comme le suggèrent les travaux d'Owan et Prendergast [Owan et al. 1997; Prendergast et al. 1997] (Figure 29). Dans ce modèle, la diminution des forces de cisaillement et d'étirement s'exerçant sur les cellules mésenchymateuses conduirait à la formation de tissu osseux et non de cartilage.



**Figure 29 : Hypothèse sur l'interaction entre forces de cisaillement et d'étirement dans le contrôle de la différenciation du tissu osseux au cours de la réparation.**

[Prendergast et al. 1997; Lacroix et al. 2002]

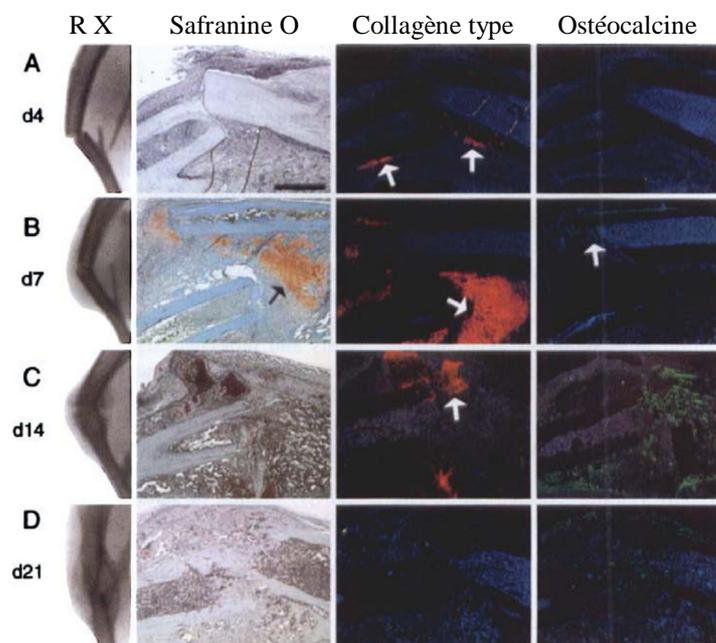
En résumé, quatre régimes mécaniques sont impliqués dans la différenciation des cellules mésenchymateuses au cours de la réparation osseuse [Prendergast et al. 1997; Carter et al. 1998; Park et al. 1998; Wolf et al. 2001; Lacroix et al. 2002; Schell et al. 2005; Isaksson et al. 2006] :

- les forces d'étirement combinées à un stress de compression hydrostatique stimulent le développement de fibrocartilage.
- un régime de forte tension d'étirement est un stimulus de la production nette de tissu fibreux.
- le stress lié à la compression induit la chondrogenèse.
- l'ossification intramembranaire survient dans les zones de faible étirement et de faible compression.

#### 4. Les fractures osseuses

Le modèle de fracture est un système idéal pour étudier la régénération du tissu osseux, sa minéralisation et son remodelage. La stabilisation des fragments osseux générés par la fracture va conditionner le mode de réparation de cette dernière.

Dans les fractures non stabilisées, le mouvement des fragments osseux les uns par rapport aux autres crée un environnement mécanique orientant la réparation vers un mode d'ossification endochondrale (**Figure 30**). Ainsi, sept jours après la fracture, le cal mou, de grande taille, est riche en collagènes de type IIa [Thompson et al. 2002] et IX [Opolka et al. 2006]. Au sein de ce cartilage se mettent en place des centres d'ossification caractérisés par l'expression d'ostéocalcine, au détriment de la chondrogenèse. L'os formé est progressivement remodelé.

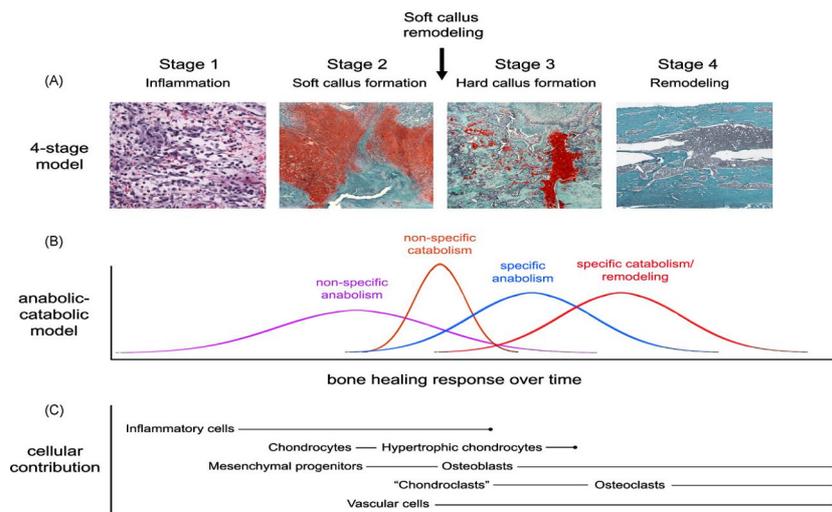


**Figure 30 : Cinétique de réparation d'une fracture non stabilisée du tibia chez la souris.**

Radiographie (R.X.), coloration à la safranine O contre colorée au fast green, immunohistofluorescence anti collagène type IIa et anti ostéocalcine à 4 (A), 7 (B), 14 (C) et 21 (D) jours après création de la fracture non-stabilisée du tibia. Les flèches indiquent la position de réaction positive. [Thompson et al. 2002]

Le processus de réparation d'une fracture osseuse a été décrit comme la juxtaposition de processus anaboliques (formation de tissu) et cataboliques (remodelage tissulaire) (**Figure 31**). Cette approche a tout d'abord été utilisée pour décrire le remodelage survenant au sein du cal dur et permettant de produire l'os lamellaire [Little et al. 2007]. Ce couplage anabolisme/catabolisme peut également décrire le remodelage du cal cartilagineux en os tissé dans le modèle de fracture non-stabilisée [Schindeler et al. 2008].

Le remodelage du cal dépend de facteurs solubles [Lehmann et al. 2005] mais également de la composition même de la matrice cartilagineuse. En effet, l'invalidation de l'expression de collagène IX induit un retard de formation d'os primaire au niveau du site de fracture, et donc un retard de remodelage du cal mou [Opolka et al. 2006].

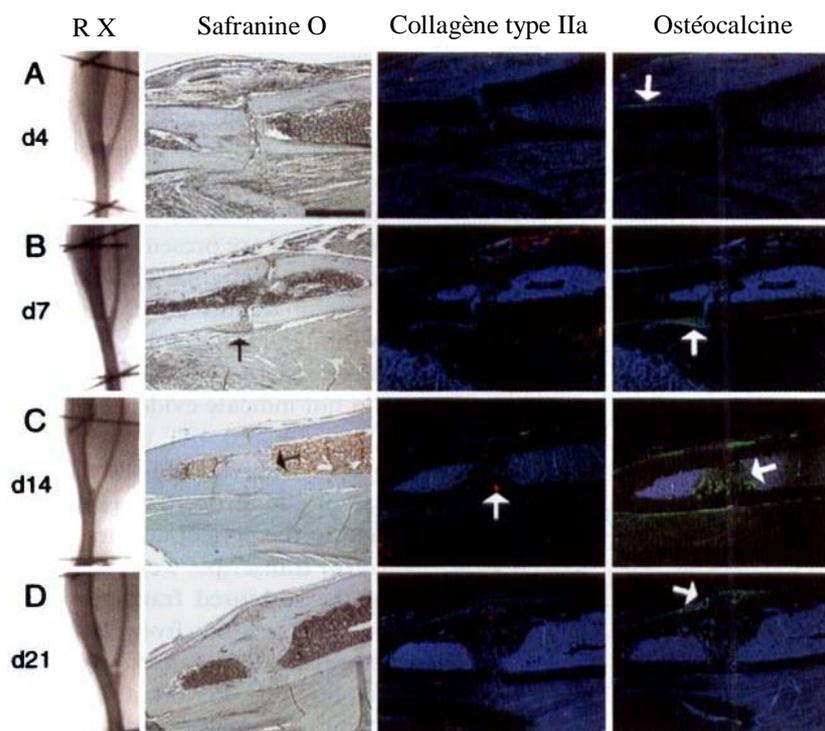


**Figure 31 : Les réponses anaboliques et cataboliques au cours de la réparation osseuse.**

(A) Représentation des quatre stades principaux de la réparation osseuse. (B) Modélisation des phases anaboliques et cataboliques de la réparation. L'anabolisme non spécifique décrit les processus précoces de la cicatrisation (hémostasie, inflammation, fibrose) communs à de nombreux tissus. Le catabolisme non spécifique constitue le remodelage du tissu cartilagineux en os primaire. (C) Contribution des différents types cellulaires au cours de la réparation. [Schindeler et al. 2008]

Par ailleurs, ce remodelage nécessite certaines activités protéasiques spécifiques. L'inactivation des gènes de métalloprotéases matricielles, MMP9 et MMP13 notamment, entraîne une persistance du cartilage induisant un retard de formation d'os primaire uniquement dans les modèles impliquant de l'ossification endochondrale, prouvant ainsi leur rôle dans la formation du cal dur [Colnot et al. 2003; Behonick et al. 2007].

La stabilisation de la fracture entraîne un processus de réparation osseuse par ossification intramembranaire (**Figure 32**). Dans ce modèle, peu voire pas de cartilage n'est détecté. Le cal formé est de taille restreinte comparé à celui d'une fracture non-stabilisée. Rapidement, l'expression de l'ostéocalcine augmente dans le périoste adjacent à la fracture et la moelle osseuse. Elle se prolonge jusqu'à la phase de remodelage osseux attestant de la formation d'un os primaire puis d'un os secondaire dans la fracture.



**Figure 32 : Cinétique de réparation d'une fracture stabilisée du tibia chez la souris.**  
Radiographie (R.X.), coloration à la safranine O contre colorée au fast green, immunohistofluorescence anti collagène type IIa et anti ostéocalcine à 4 (A), 7 (B), 14 (C) et 21 (D) jours après création de la fracture stabilisée du tibia. Les flèches indiquent la position de réaction positive.  
[Thompson et al. 2002]

Il est intéressant de voir que l'utilisation parallèle de ces modèles de fractures permet de mettre en évidence des différences dans les mécanismes cellulaires et moléculaires de l'ossification endochondrale et intramembranaire au cours de la réparation. Ces modèles sont fréquemment utilisés en recherche orthopédique. Cependant, ils restent mal adaptés à l'étude de biomatériaux de comblement pour lesquels les modèles de lésions mieux contrôlés et incapables de se réparer seules (lésions critiques) sont préférés. Ils sont également inadaptés à l'étude de la réparation de l'os cortical ou de l'os spongieux.

## 5. Les défauts, perforations ou « défaut » osseux

Les perforations osseuses, ou « défauts », sont créées lors d'interventions chirurgicales (curetage, exérèse de tumeur, prélèvements de greffons osseux, remplacement des ligaments). Le tissu osseux possède la capacité de combler spontanément un défaut osseux de petite taille. Au delà d'une certaine taille, la réparation naturelle compromise. Hollinger et Kleinschmidt parlent de défaut de taille critique lorsqu'un défaut osseux, non traité, présente moins de 10 % de réparation au cours de la vie de l'animal [Hollinger et al. 1990; Lindsey et al. 1998]. Il est alors nécessaire d'avoir recours à différentes stratégies pour améliorer la réparation (biomatériaux, facteurs de croissance, thérapie cellulaire).

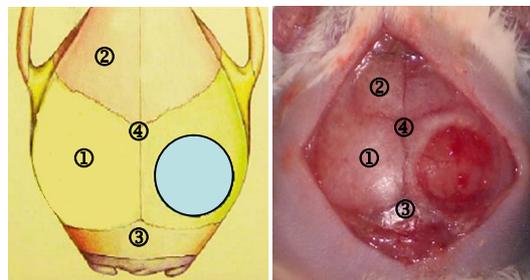
Le développement de modèles animaux pertinents de défauts osseux est donc nécessaire pour développer des stratégies et des produits d'ingénierie osseux dédiés au traitement de

défauts osseux et à l'amélioration de la réparation osseuse [Hollinger et al. 1990]. Malgré la pertinence des modèles développés sur gros animaux [Reichert et al. 2009] tels que le cochon, la brebis, le chien, le chat, les lapins, les justifications éthiques et économiques tendent à favoriser le développement des modèles rongeurs. Enfin, malgré sa petite taille, la souris reste un modèle de choix grâce à la génétique expérimentale.

Trois modèles de défauts murins sont majoritairement rencontrés dans la littérature : les défauts de la calvaria, les défauts de l'os cortical diaphysaire (fémur ou tibia) et les défauts épi-métaphysaires.

### 5.1.1. Le modèle calvaria

L'os pariétal ou calvaria est un os plat supportant la réalisation de défauts osseux de taille critique sans risque de fracture (**Figure 33**). Subissant peu de forces mécaniques (compression notamment), la calvaria se régénère par ossification intramembranaire [Hammerle et al. 1995].



**Figure 33 : Défaut de taille critique réalisé dans une calvaria de souris.**

Le défaut critique de 4 mm de diamètre est réalisé dans l'os pariétal comme schématisé (cercle bleu) sur la droite de la figure. Os pariétal (1), os frontal (2), os interpariétal (3), suture osseuse ou bregma (4).

(Données personnelles)

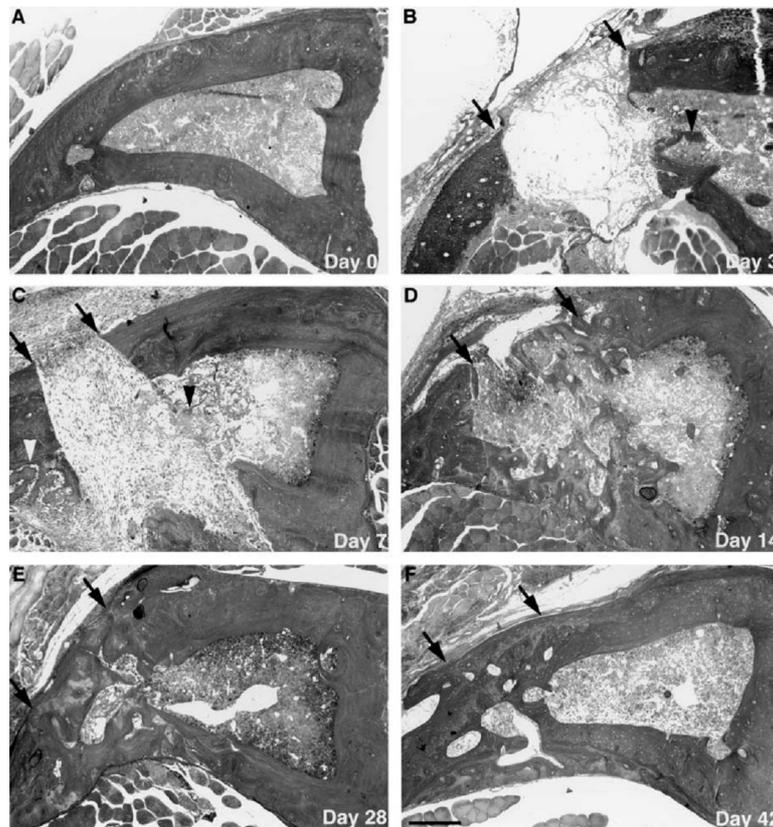
Actuellement, la calvaria reste le modèle de choix en ingénierie osseuse pour évaluer les effets de facteurs de croissance [Alden et al. 2000; Virk et al. 2008], de biomatériaux [Robinson et al. 1995; Kamakura et al. 1999; Schlegel et al. 2006; Findikcioglu et al. 2009; Park et al. 2009] et de cellules sur la réparation osseuse [Breitbart et al. 1998; Tsuchida et al. 2003; Cowan et al. 2004; Degano et al. 2008].

Cependant, l'extrapolation des résultats obtenus dans un modèle de calvaria aux os longs reste toutefois périlleuse car ce modèle reste inadapté à l'étude de la réparation de l'os spongieux. Il apparaît donc nécessaire de développer des modèles plus adaptés, tels que les défauts des os longs.

### 5.1.2. Le modèle de défaut cortical diaphysaire

Le modèle de lésion diaphysaire chez la souris consiste en une chirurgie rapide, reproductible, peu traumatique pour l'animal et n'aboutissant pas à la fracture franche de l'os. Les contraintes mécaniques au niveau du tissu blessé conduisent à une réparation par ossification intramembranaire. Ce modèle, cependant, ne permet pas de faire des défauts osseux de taille critique à cause de la taille même des os chez cet animal.

Les travaux de Campbell et al résument bien les différents stades de la réparation de ce type de défaut osseux réalisé sur un tibia murin (**Figure 34**) [Campbell et al. 2003]. Trois jours après la réalisation d'une perforation de 0,5 mm dans la diaphyse du tibia, le trou est comblé par un cal hémostatique. Il est ensuite infiltré par des cellules d'aspect mésenchymateux, formant une matrice fibreuse et dense. Parallèlement, l'expression de collagène de type I et d'ostéopontine sont détectables à 7 jours. L'apparition d'os primaire au sein de ce cal mou se fait autour du 9<sup>ème</sup> jour postopératoire. Au 14<sup>ème</sup> jour, l'os néoformé forme un réseau d'aspect trabéculaire fixant la coloration au Von Kossa. L'os remplissant le défaut osseux est remodelé sous forme d'os lamellaire au 28<sup>ème</sup> jour.



**Figure 34 : Réparation d'un défaut cortical au niveau du tibia.**

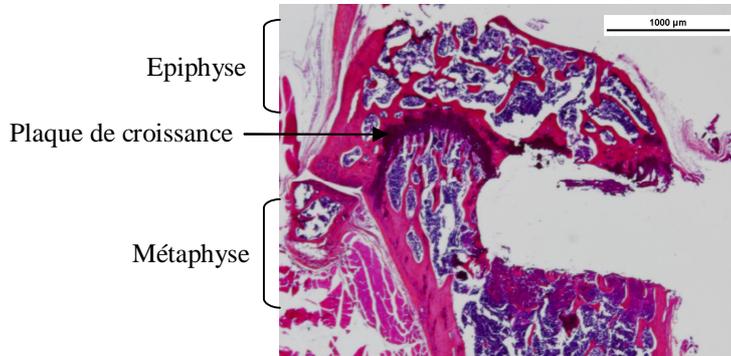
Coupes transversales d'un tibia normal (A) et d'un tibia à 3 (B), 7 (C), 14 (D), 28 (E) et 42 jours (F) après perforation. Les flèches indiquent les bordures du défaut et les têtes de flèches les débris osseux générés lors de la réalisation du trou. Les coupes ont été colorées au trichrome de Masson. La barre représente 200  $\mu$ m.

[Campbell et al. 2003]

Ce modèle de réparation a fait l'objet de quelques études afin d'identifier l'origine des cellules ostéoblastiques impliquées dans la cicatrisation. Ainsi, la transplantation de cellules de moelle osseuse de souris ROSA26, exprimant la  $\beta$ -galactosidase a permis de mettre en évidence l'origine médullaire des ostéoclastes recrutés lors du remodelage du cal dur [Colnot et al. 2006]. Ce modèle a également été utilisé pour démontrer le rôle de la MMP13 dans la l'ossification intramembranaire [Behonick et al. 2007], pour tester des thérapies adénovirales surexprimant la BMP2 pour améliorer la réparation [Virk et al. 2008] ou encore évaluer l'impact de molécules thérapeutiques sur la réparation, notamment l'effet délétaire des bisphosphonates [Nagashima et al. 2005].

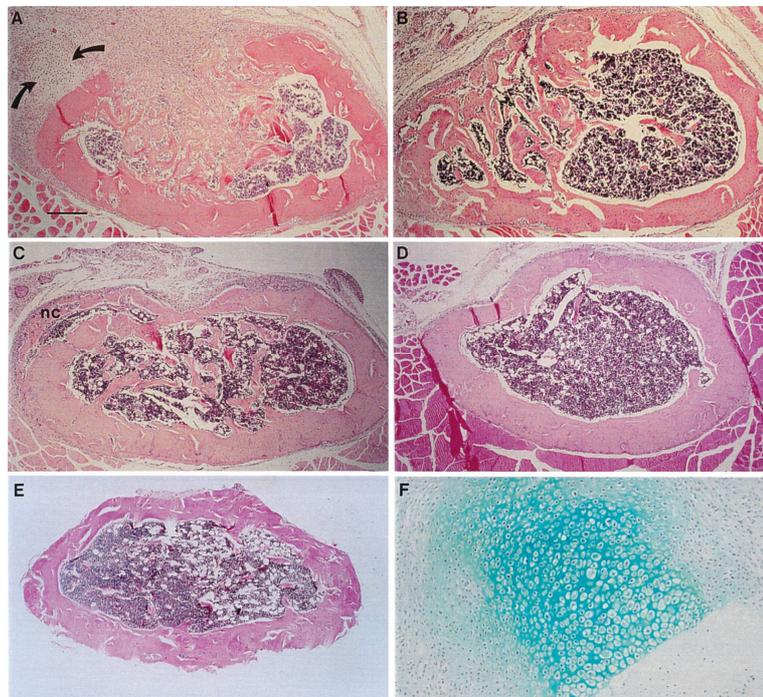
### 5.1.3. Les défauts épi-métaphysaires

Les défauts épi-métaphysaires sont peu utilisés dans la littérature pour étudier la réparation osseuse. Ils présentent pourtant la particularité d'associer à la lésion de l'os cortical, une lésion de l'os trabéculaire voir même de la plaque de croissance (**Figure 35**).



**Figure 35 : Défaut épi-métaphysaire fémoral murin de 1,6 mm de diamètre.**  
Coupe sagittale de fémur décalcifié après création de la perforation épi-métaphysaire. Coloration Hématoxyline-Eosine-Safran. (Données personnelles)

Ce type de lésion, à proximité de la moelle osseuse se répare par ossification intramembranaire, sans phase cartilagineuse et ni développement de réaction périostée (**Figure 36**). [Charnley et al. 1952; Uthoff et al. 1981; Uusitalo et al. 2001]



**Figure 36 : Réparation d'un défaut cortico-trabéculaire de l'os métaphysaire.**  
L'histologie a été réalisée avant la chirurgie (E), à 1 (A, F), 2 (B), 3 (C) et 6 (D) semaines de réparation. Du cartilage est fréquemment observé à proximité du défaut (flèche en A). La réparation se fait par ossification intramembranaire. Les coupes transversales, décalcifiées sont colorées à l'hématoxyline-éosine (A-E) et au bleu alcian (F). [Uusitalo et al. 2001]

Quelques études ont utilisé ce modèle pour l'évaluation de biomatériaux *in vivo* [Griffon et al. 2001; Peters et al. 2006; Walsh et al. 2008; Grellier et al. 2009] ou de facteurs de croissance [Chen et al. 2004; Morgan et al. 2008].

La réparation de défauts, diaphysaire et épi-métaphysaire, sera discutée dans la première partie des résultats de cette thèse. Seront particulièrement abordés le processus de réparation, l'effet du diamètre et l'effet de la position du défaut.

## **6. Les modulateurs de la réparation**

Au cours de la réparation osseuse, trois grandes catégories d'acteurs agissent de manière coordonnée afin de mettre en place la restauration du tissu osseux. Ces acteurs sont les facteurs de croissance libérés localement, les cellules ostéoprogénitrices pouvant avoir différentes origines (voir paragraphe 2 en page 46), et enfin le microenvironnement et notamment les forces mécaniques (voir paragraphe 3 en page 49). Giannoudis et al dans un cadre de réparation osseuse guidé par un biomatériau, introduisent un quatrième paramètre, la matrice ostéoinductive, et proposent ainsi un concept quaternaire nommé « diamond concept » à la base de la réparation osseuse [Giannoudis et al. 2007].

### **6.1. Les facteurs solubles**

#### **6.1.1. les cytokines inflammatoires**

L'interleukine IL-1, l'interleukine IL-6 le TNF- $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor) jouent un rôle important dans l'initiation de la cascade de signalisation cellulaire et moléculaire de la réparation osseuse. Ils sont sécrétés par les cellules inflammatoires, les macrophages et les cellules mésenchymateuses présentes dans le périoste adjacent au site de lésion. Elles induisent le chimiotactisme d'autres cellules inflammatoires, activent la production de matrice extracellulaire, stimule l'angiogenèse et le recrutement de cellules mésenchymateuses au niveau de la zone de réparation. Leur profil d'expression est biphasique avec un premier pic d'expression deux jours après la lésion, puis un second au moment du remodelage de l'os primaire. [Gerstenfeld et al. 2001; Kon et al. 2001; Gerstenfeld et al. 2003; Dimitriou et al. 2005; Lehmann et al. 2005; Giannoudis et al. 2007; Tsiridis et al. 2007; Yang et al. 2007]

#### **6.1.2. Les facteurs de croissance**

##### **- Le PDGF (Platelet Derived Growth Factor)**

Le PDGF est synthétisé par les plaquettes, les monocytes, les macrophages, les cellules endothéliales et les ostéoblastes. C'est un puissant mitogène pour les cellules mésenchymateuses.

Il est sécrété précocement au cours de la réparation lors de la dégranulation des plaquettes. Il intervient dans le chimiotactisme des cellules inflammatoires et dans le recrutement et la prolifération des cellules mésenchymateuses. Nash et al ont montré une augmentation de la densité du volume du cal formé suite à une ostéotomie chez les lapins traités au PDGF. [Bolander 1992; Nash et al. 1994; Andrew et al. 1995; Fiedler et al. 2002; Lieberman et al. 2002]

- Le TGF- $\beta$  (Transforming Growth Factor)

Libéré par les plaquettes durant la phase inflammatoire, le TGF- $\beta$  semble jouer un rôle dans la formation du cal. Il est également produit par les chondrocytes et les ostéoblastes. C'est un stimulateur chimiotactique des cellules mésenchymateuses et de leur prolifération ; Il stimule la production de matrice extracellulaire dans laquelle il se retrouve séquestré, ainsi que la production de BMP par les ostéoprogéniteurs. [Bolander 1992; Bostrom et al. 1998; Lieberman et al. 2002]

- Les BMP (Bone Morphogenetic Proteins)

Les BMPs sont produites par les cellules mésenchymateuses, les ostéoprogéniteurs, les ostéoblastes et les chondrocytes. La famille des BMPs regroupent un grand nombre de membres. Les BMPs 2, 6 et 9 sont décrites comme étant les plus puissants inducteurs ostéoblastiques des cellules mésenchymateuses. Elles sont capables d'induire l'expression d'autres facteurs de croissance et angiogéniques comme l'IGF et le VEGF. Enfin, elles stimulent la formation osseuse en favorisant l'angiogénèse. [Hughes et al. 1995; Marie 2000; Deckers et al. 2002; Fiedler et al. 2002; Valdimarsdottir et al. 2002; Cheng et al. 2003]

- Le FGF (Fibroblast Growth Factor)

Durant la réparation osseuse, le FGF est sécrété par les cellules de l'inflammation (macrophages, monocytes), les chondrocytes et les ostéoblastes. Dans un modèle d'ostéotomie réalisé sur un chien, une simple injection de FGF induit une augmentation précoce de la taille du cal. Le FGF est donc un facteur stimulateur de la réparation osseuse. [Tanaka et al. 2003; Chen et al. 2004; Schmid et al. 2009]

## **6.2. Les protéines de la matrice extracellulaire dans la réparation osseuse**

La matrice osseuse, elle-même, de par sa composition protéique notamment, participe à la régulation des processus cellulaires et moléculaires de la réparation osseuse. Ainsi de nombreuses études ont porté sur l'expression, la cartographie et l'effet des protéines matricielles, collagéniques ou non, au cours de la réparation osseuse chez les rongeurs. [Jingushi et al. 1992; Hiltunen et al. 1993; Sandberg et al. 1993; Sato et al. 1998]

Les profils d'expression des collagènes, protéines majoritaires de la matrice osseuse, sont particulièrement bien décrits. Brièvement, les collagènes de types II, IX et l'aggrécane sont caractéristiques de la réparation par ossification endochondrale. Le collagène de type I s'exprime dès le 5<sup>ème</sup> jour de réparation, au niveau des centres d'ossification primaire en bordure des fragments d'une fracture non stabilisée, et au sein des défauts se réparant par ossification intramembranaire.

Dans l'ossification endochondrale, mise en place dans les fractures non-stabilisées, la composition du cal cartilagineux joue un rôle dans le contrôle du remodelage du cartilage. Ainsi, l'absence de collagène IX induit une persistance du cartilage au niveau du site de fracture et un retard de remodelage en os primaire [Opolka et al. 2006].

La matrice néoformée au cours de la réparation est identique en composition que la matrice native. A ce titre, elle contient des protéines non collagéniques synthétisées par les cellules ostéogéniques. Ces protéines sont connues pour intervenir à différents niveaux du tissu osseux : organisation de la matrice, minéralisation et biologie des cellules osseuses. Ainsi l'ostéonectine est l'une des protéines non collagéniques qui s'exprime précocement au cours de la réparation, elle est détectée par immunohistochimie autour du 4<sup>ème</sup> jour.

L'ostéopontine se retrouve dès 7 jours, localisée à l'interface entre le tissu mou et os primaire. L'ostéocalcine quand à elle s'exprime au-delà du 9<sup>ème</sup> jour.

Le rôle des protéines matricielles non collagéniques sur la réparation tissulaire a été étudié grâce aux modèles de génétique expérimentale [Alford et al. 2006]. D'une façon générale, la déficience génique pour une protéine matricielle n'induit pas d'altérations manifestes du phénotype osseux. Cependant, en condition de réparation tissulaire, le phénotype de ces animaux diffère de celui des animaux sauvages, comme c'est le cas pour l'ostéopontine (voir chapitre Résultats paragraphe 2.1.2. L'ostéopontine). Toutefois l'implication de ces protéines dans la réparation du tissu osseux n'a pas fait l'objet de nombreuses études.

L'absence d'ostéopontine diminue la vascularisation et la régression du cal cicatriciel formé lors d'une fracture, ainsi que du remodelage osseux conduisant à un retard de réparation [Duvall et al. 2007]. Dans un modèle de lésion cutanée, la délétion d'ostéopontine s'associe à une altération des fibres de collagènes [Liaw et al. 1998].

La tenascine C (revue dans [Hsia et al. 2005]) apparaît comme un modulateur négatif au cours de la réparation [Alford et al. 2006]. L'ostéonectine a fait l'objet d'études au cours de la réparation d'une lésion cutanée. Cependant deux études présentent des résultats contradictoires quand à l'effet de la déficience sur la réparation tissulaire [Basu et al. 2001; Bradshaw et al. 2002].

La déficience en BSP engendre un retard de réparation intramembranaire d'un défaut osseux [Malaval et al. 2009; Malaval et al. 2009] (Annexe).

Quelque soit le type de lésions osseuses, les mécanismes mis en place pour restaurer l'architecture et la fonction de l'os, récapitulent les événements cellulaires et moléculaires de la formation embryonnaire osseuse et du remodelage. Cependant, l'origine des cellules, l'inflammation, et l'environnement mécanique sont trois spécificités de ce contexte pathologique.

La réparation osseuse résulte de l'interaction étroite de facteurs de croissance, de cellules ostéogéniques (ostéoblastes, chondrocytes,...), de l'environnement mécanique et de la matrice extracellulaire. Bien que cette dernière fasse l'objet de nombreux travaux dans le domaine des biomatériaux osseux, le rôle des protéines de la matrice extracellulaire dans la réparation est mal connu. L'étude de la matrice et la compréhension des coopérations mécaniques, moléculaires et cellulaires apparaissent pertinentes pour l'amélioration des stratégies en ingénierie du tissu osseux.

## **Objectifs**

---

Les principales thématiques de recherche développées au sein de l'unité INSERM U577 sont :

- l'établissement et la caractérisation de modèles de culture de cellules souches ou progénitrices, en mono- ou en co-culture, soumises à des contraintes mécaniques et biochimiques, et l'étude de leurs comportements au contact de biomatériaux.
- la conception, l'élaboration et la caractérisation de matériaux biocompatibles, biofonctionnels selon les stratégies d'ingénierie moléculaire, macro-moléculaire et des surfaces, en vue de fonctionnaliser des biomatériaux innovants ou préexistants pour leur conférer un caractère bioactif vis à vis de la composante biologique.
- l'évaluation de l'efficacité des produits de l'ingénierie tissulaire fonctionnalisés et/ou cellularisés *in vivo* grâce à des modèles animaux ; l'étude des mécanismes moléculaires de réparation osseuse grâce à la génétique expérimentale. Le suivi des mécanismes de réparation naturelle et artificielle par différentes techniques plus ou moins invasives.

Les travaux effectués au cours de cette thèse s'intègrent parfaitement dans ce dernier thème de recherche. Les travaux antérieurs du laboratoire dans ce domaine ont consisté à tester différents biomatériaux, bruts ou fonctionnalisés et/ou cellularisés, tels que le phosphate de cellulose [Fricain et al. 2002], le phosphate de calcium biphasique (mélange d'hydroxyapatite et de  $\beta$ -Tri-Calcium Phosphate) [Catros et al. 2009], ou encore le titane greffé de peptide RGD cyclique et cellularisé avec des ostéoprogéniteurs [Pallu et al. 2009], en site osseux chez le lapin.

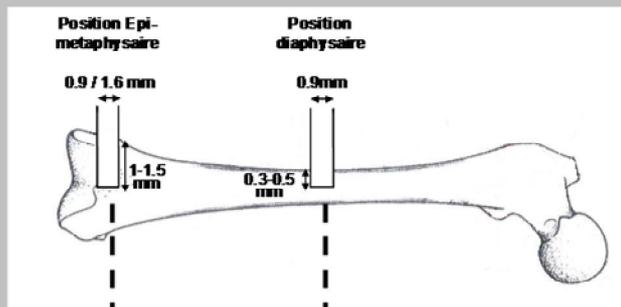
Cependant le modèle lapin, comme tous les modèles grands animaux, n'est pas approprié pour le greffage de cellules humaines, écartant ainsi le test de biomatériaux cellularisés avec ces cellules. De plus, ces modèles de grandes tailles sont peu adaptés aux études pharmacologiques à cause de la quantité de produits nécessaire. Enfin, ils ne permettent pas d'études de génétique expérimentale.

Le modèle murin, malgré sa petite taille, possède de nombreux avantages pour l'étude des mécanismes de la réparation osseuse tels que leur production facile et à faible coût, l'accès à la génétique expérimentale, la possibilité d'implanter des cellules humaines chez des souches immuno-déficientes.

Face à cette problématique et compte tenu des précédentes données du laboratoire, les objectifs et les lignes directrices de la thèse ont été (Figure 37) :

- développer et caractériser des modèles de lésions osseuses chez la souris pour permettre d'une part l'étude de biomatériaux de comblement, fonctionnalisés et / ou cellularisés, en site osseux et d'autre part l'étude de la réparation osseuse par génétique expérimentale.
- étudier le rôle de protéines de la matrice extracellulaire du tissu osseux, l'ostéopontine (OPN) et la sialoprotéine osseuse (BSP) dans la réparation d'un défaut osseux, grâce aux modèles de lésions développés combinés aux modèles de génétique expérimentale.

## Axe 1 : Développement et caractérisation de la réparation dans des modèles de lésions osseuses de type « défaut »



- Réparation naturelle de l'os cortical diaphysaire et trabéculaire épi-metaphysaire chez la souris (Effet de la **position** du défaut sur la réparation) (**ARTICLE 1**)

- Effet de la **taille** du défaut sur la réparation osseuse (résultats complémentaires)

Souris déficiente pour le gène de l'**ostéopontine (KO OPN)**

Souris déficiente pour le gène de la sialoprotéine osseuse (**KO BSP**)

## Axe 2 : Implication des protéines matricielles dans la réparation de défauts osseux corticaux et trabéculaires

- Effet de l'OPN et de la BSP sur la réparation de l'os **cortical diaphysaire (ARTICLE 2)**

- Effet de l'OPN et de la BSP sur la réparation de l'os **spongieux épi-metaphysaire (ARTICLE 3)**

Figure 37 : Schéma récapitulatif des objectifs de la thèse.

# Résultats

---

# 1. Développement et caractérisation de la réparation de modèles de lésions osseuses de type « défaut » chez la souris.

## 1.1. Introduction

Le tissu osseux a la capacité de se régénérer de façon naturelle. Cependant, dans certains cas cliniques, tels que l'ostéolyse sévère, l'exérèse de métastases osseuse ou l'ostéonécrose, la réparation spontanée est compromise et incomplète. Il est alors nécessaire de faire appel à des stratégies de reconstruction et à l'utilisation de matériaux de comblement. Par ailleurs, l'amélioration de la réparation nécessite de mieux connaître les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans les différentes étapes de la réparation osseuse. Il apparaît donc nécessaire d'avoir des modèles, bien décrits et pertinents, de lésion osseuse permettant d'une part d'étudier la réparation osseuse, naturelle, par génétique expérimentale, et d'autre part, permettant l'évaluation *in vivo* des produits d'ingénierie du tissu osseux.

Le premier modèle murin développé au sein de notre laboratoire fut un modèle de défaut diaphysaire. Brièvement, une perforation de 0,9 mm de diamètre a été réalisée dans la diaphyse du fémur sur des souris C57Bl6/J âgées de 19 semaines (Figure 38). La réparation de ce défaut a été suivie à 7, 14, 21, 28 et 35 jours après chirurgie par microtomographie haute résolution aux rayons X, grâce à un micro scanner *Explore Locus SP* (General Electric Healthcare) et par histologie.

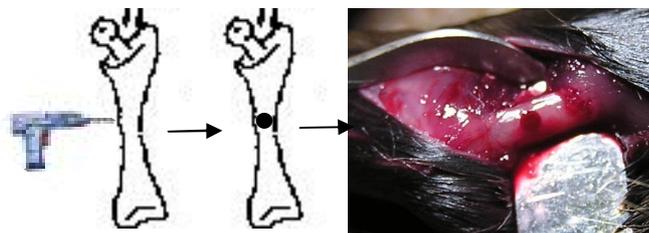
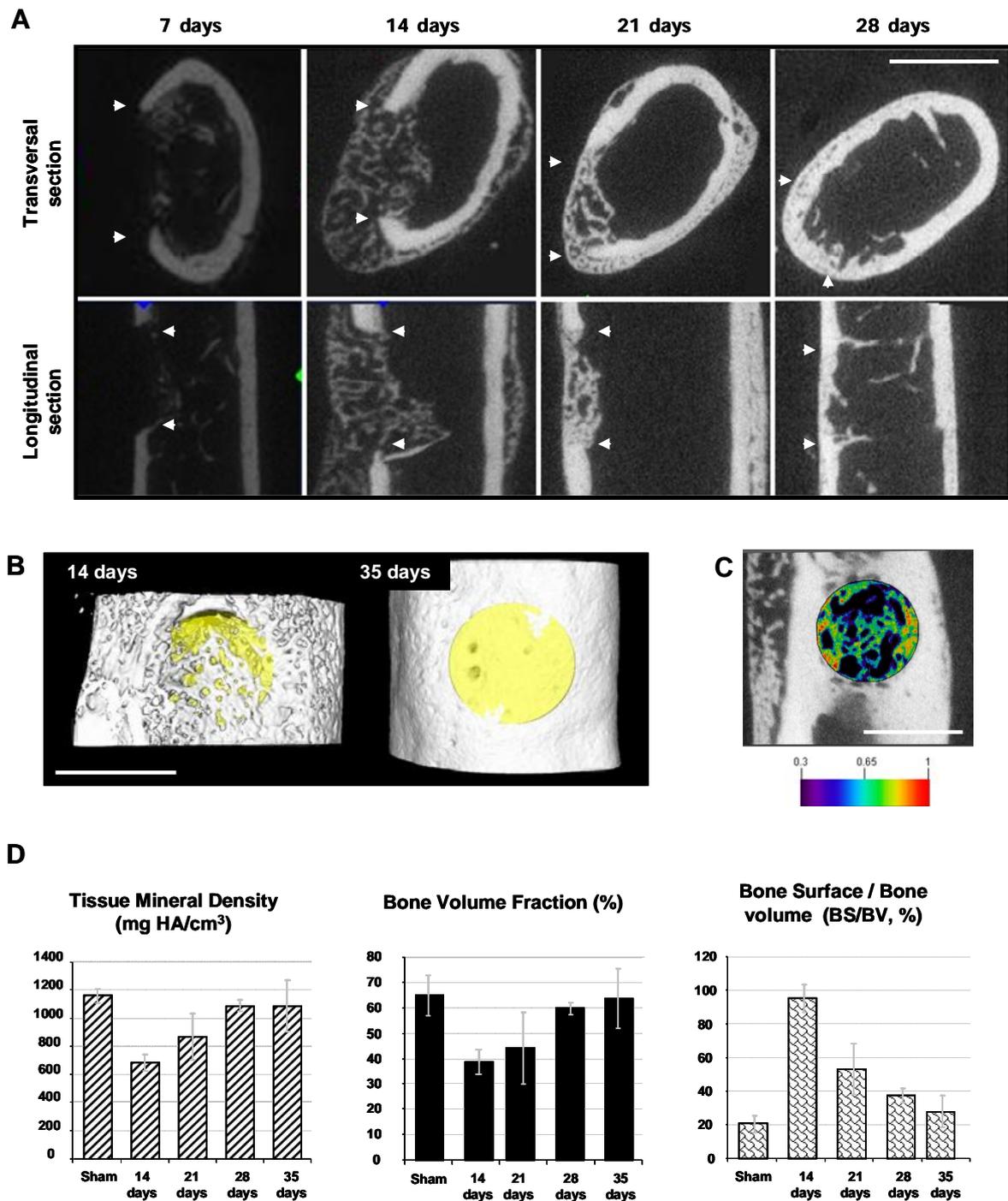


Figure 38 : Modèle de défaut diaphysaire.

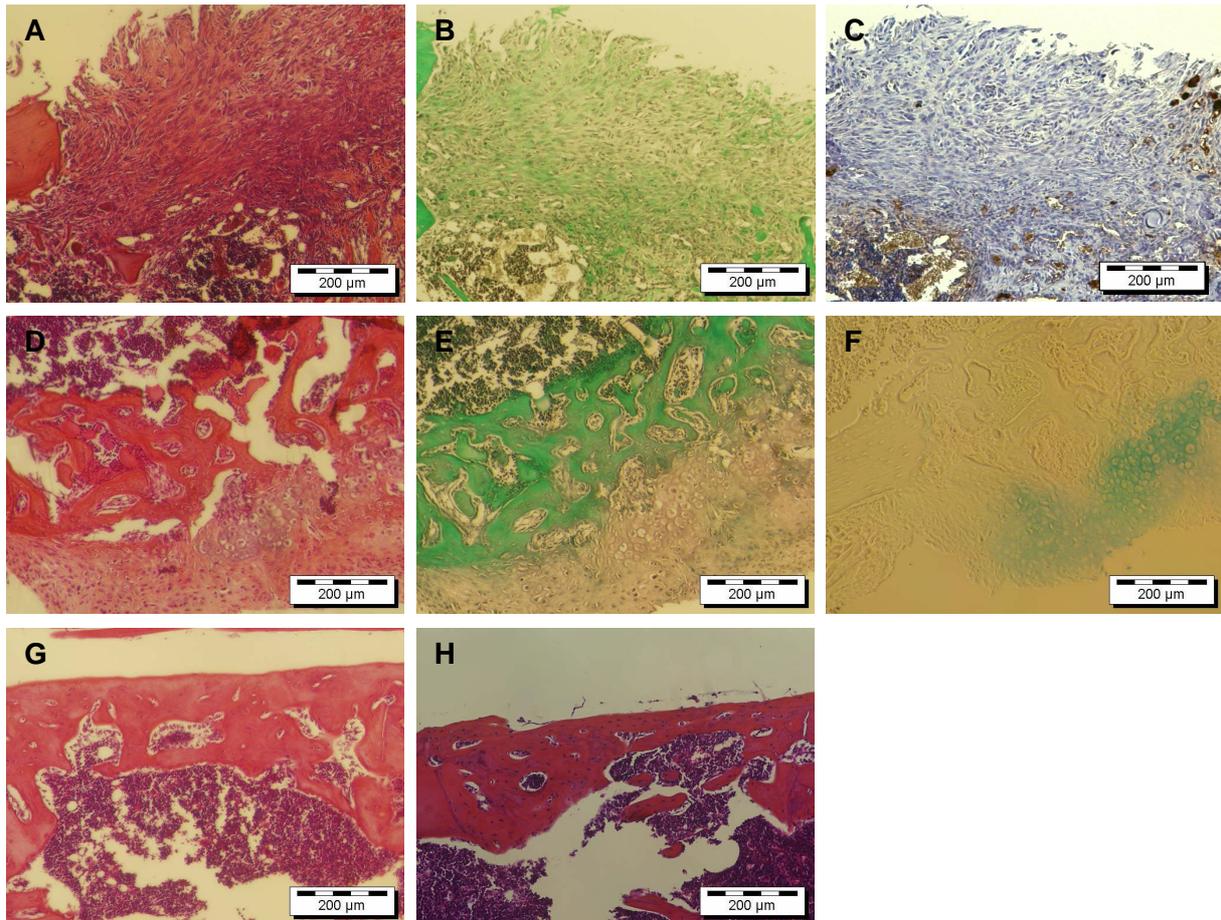
L'analyse de la réparation du défaut diaphysaire est présentée dans la Figure 39. Sept jours après la chirurgie, des éléments minéralisés, correspondants à des débris osseux formés par la perforation, sont présents dans la zone médullaire en regard du défaut (Figure 39A). A 14 jours, un réseau d'os minéralisé d'aspect pseudo-trabéculaire remplit le défaut (Figure 39A et B). Le développement d'une réaction d'ossification dans le périoste est variable entre les échantillons. L'os nouvellement formé au cœur du cortex, se condense pour former à 28 jours un os d'aspect mature, rendant quasiment impossible la localisation du défaut sur la diaphyse à 35 jours (Figure 39B). La cartographie de la densité de l'os nouvellement formé dans le défaut révèle que la formation osseuse se fait de façon centripète (Figure 39C). La formation de l'os dans le défaut a été quantifiée dans une région d'intérêt ayant une forme cylindrique de 0,8 mm de diamètre dessinée et centrée à l'intérieur du défaut, et d'épaisseur égale à l'os cortical (Figure 39C). Après 35 jours de réparation, les valeurs de densité (TMD), de volume de la fraction osseuse (BVF) et du rapport surface sur volume osseux (BS/BV), mesurées dans le défaut atteignent une valeur équivalente à celles mesurées dans une région diaphysaire similaire d'une souris témoin (Sham, Figure 39D).



**Figure 39 :  $\mu$ CT analysis of a diaphyseal defect in mouse.**

A:  $\mu$ CT images of diaphyseal defect 7, 14, 21 and 28 days after surgery. White arrowheads show the cortical edges of the defect. B: 3D reconstruction of diaphysis 14 and 35 days after surgery. Yellow area delimited the ROI used for quantitative analysis of new bone formed within the defect. C:  $\mu$ CT mapping of the density of newly formed bone within the gap at 14 days. Colour scale indicates the correspondence between colours and tissue mineral density ( $\text{g}/\text{cm}^3$ ). Bar scales represent  $900\mu\text{m}$  (A, B, C). D: Quantitative analysis of new bone formed within the defect. Measurements were performed from  $\mu$ CT images using the Advanced Bone Analysis<sup>TM</sup> software in a ROI (region of interest) positioned within the gap (yellow area, B) and in a similar region of a sham-operated femur (sham). (Unpublished personal data)

L'analyse histologique de la réparation de ce défaut a été réalisée à 7, 14, 21 et 28 jours après la chirurgie (Figure 40). A 7 jours, le défaut est comblé par un cal cicatriciel d'aspect fibreux riche en cellules mésenchymateuses (A). Une coloration au rouge Sirius atteste de l'absence de fibre de collagène dans la zone de comblement (non montré). Ce cal est un cal mou, non minéralisé et également avasculaire (B et C). 14 jours après la perforation, la cavité est remplie d'un os minéralisé et vascularisé d'aspect trabéculaire (D et E). Dans certains échantillons, une réaction d'ossification endochondrale est observée au niveau du périoste, formant un cartilage hypertrophique (D-F). Le réseau trabéculaire au cœur du défaut se densifie et forme un os lamellaire à 28 jours (G et H).



**Figure 40 : Histological analysis of a diaphysis defect at 7 (A, B, C), 14 (D, E, F), 21 (G) and 28 (H) days after surgery.**

All sections were obtained from decalcified femurs. A, D, G, and H: H-E-S staining. B and E: Green light staining. C: Anti-CD31 immunohistostaining. F: Alcian Blue staining. (Unpublished personal data)

En résumé, un défaut cortical réalisé dans la diaphyse d'un fémur murin se répare spontanément en 35 jours, de façon centripète par ossification intramembranaire. La réparation de ce modèle est particulièrement bien documentée dans la littérature scientifique [Campbell et al. 2003]. Ce modèle apparaît approprié pour l'étude de la réparation naturelle de l'os cortical. Cependant, il n'est pas pertinent pour l'évaluation de matériaux de comblement ou l'étude de la réparation de l'os trabéculaire pour lesquelles le défaut épimétaphysaire apparaît plus adapté.

Un défaut épi-métaphysaire conduit à la lésion de l'os cortical métaphysaire, de l'os spongieux ou trabéculaire et d'une partie de la plaque de croissance. Peu de travaux décrivant son profil de réparation ont été publiés [Charnley et al. 1952; Uthoff et al. 1981; Uusitalo et al. 2001]. Dans ce type de lésion, l'ossification intramembranaire permet de régénérer l'os cortical, l'os trabéculaire et la plaque de croissance, bien que pour celle-ci la réparation n'aboutisse pas à une structure identique. La plus part de ces études s'est attachée à décrire la réparation de l'os cortical épi-métaphysaire sans prendre en compte celle de l'os trabéculaire.

Dans le premier article, nous avons caractérisé la cinétique et le mode de réparation d'un défaut épi-métaphysaire de 0,9 mm de diamètre et nous l'avons comparé à la cinétique de réparation d'un défaut osseux de même taille, positionné dans la diaphyse fémorale chez la souris.

**1.2. Article 1 : Caractérisation de la réparation dans les modèles de défaut diaphysaire et métaphysaire.**

***Drilled hole defects in mouse femur as models of intramembranous cortical and cancellous bone regeneration***

Laurent Monfoulet, Bénédicte Rabier, PhD, Olivier Chassande, PhD, and Jean-Christophe Fricain, DDS, PhD

INSERM U577, Bordeaux, F33076, France; Université Victor Segalen, Bordeaux, F33076, France.

Accepté pour publication dans *Calcified Tissue International*

# Drilled hole defects in mouse femur as models of intramembranous cortical and cancellous bone regeneration.

Laurent Monfoulet<sup>a,b</sup>, Bénédicte Rabier<sup>a,b</sup>, PhD, Olivier Chassande<sup>a,b,c</sup>, PhD, and Jean-Christophe Fricain<sup>a,b</sup>, DDS, PhD

<sup>a</sup> Université Victor Segalen Bordeaux 2, Bordeaux, F-33076, France

<sup>b</sup> INSERM U 577, Bordeaux, F-33076, France

<sup>c</sup> Plateforme Technologique d'Innovation Biomédicale, Université Victor Segalen Bordeaux2, CHU de Bordeaux, F-33604, France

Corresponding author: Olivier Chassande ; Olivier.Chassande@inserm.fr

Short title: Bone defects in mouse.

**ABSTRACT:** In order to identify pertinent models of cortical and cancellous bone regeneration, we compared the kinetics and patterns of bone healing in two defect protocols in mouse femur. The first protocol consisted in a 0.9 mm diameter through-and-through cortical hole drilled in the mid-diaphysis. The second protocol was a 0.9 mm diameter, 1 mm deep perforation in the distal epi-metaphyseal region, which destroyed part of the growth plate and cancellous bone. Bone healing was analyzed by *ex-vivo* micro-computerized X-Ray tomography and histology. In the diaphysis, the cortical gap was bridged with woven bone within 2 weeks. This newly formed bone was rapidly remodelled into compact cortical bone which showed characteristic parameters of intact cortex 4 weeks after surgery. In the epi-metaphysis, bone formation was initiated at the deepest region of the defect and spread slowly towards the cortical gap. In this position, newly formed bone quickly adopted the characteristics of trabecular bone, whereas a thin compact wall was formed at its external border, which reached the density of intact cortical bone but failed to bridge the cortical gap even 13 weeks after surgery. This comparative study points the diaphyseal defect as a model of cortical bone healing and the epi-metaphyseal defect as a model of cancellous bone repair. Both models offer a reliable, convenient alternative to fracture models to investigate the cellular and molecular mechanisms of bone regeneration involved after surgical treatment of different bone lesions such as tumours, dystrophic and dysplastic processes or aseptic necrosis.

**KEY WORDS:** bone healing, bone regeneration, cortical bone, spongy bone, mouse bone

## **Introduction**

Healing of bone lesions involves different processes according to the type of bone which is wounded (cortical or spongy), to the position and size of the lesion which condition the mechanical strains exerted on the damaged tissues as well as cell and scaffold availability [1]. In contrast to lesions of limited dimensions which can repair spontaneously, critical size defects require additional surgical procedures to support bone regeneration. Thus, in some clinical situations such as non unions, severe osteolysis, excision of bone metastases or osteonecrosis, spontaneous bone repair is compromised or incomplete. Most clinical cases concern bone fractures, which disrupt both cortex and marrow, generating variable patterns of distraction and mechanical instability. In these instances, bone regeneration involves some level of endochondral ossification and cortical bone regeneration occurs secondarily as a slow, complex process involving cellular and molecular actors from bone marrow, periosteum, endosteum and neighbouring soft tissues origin [2, 3]. In summary most of the clinical cases of bone injury involve complex and variable patterns of healing.

Many of the models used in experimental animal studies alter cortical and spongy bone structure and involve mixed intramembranous and endochondral bone formation processes with precursor cells of different origins. Few models are currently available to address specifically the mechanisms of cortical or spongy bone repair and to test the efficacy of pharmacological treatments. Despite their small size, mice have advantages such as their easy production at low cost, access to experimental genetics to investigate the mechanisms of bone healing, and the ability to use small quantity of drugs due to the small size of the defect.

Several bone defects models have been developed in mice including non-union [4], distraction [5] and cortical defect models [6-9]. Cortical perforations have been generated either in femur metaphysis [6], in femur epi-metaphysis [8], in femur diaphysis [9] or in tibia diaphysis [7]. These models have been shown to be suitable for injection of adenovirus [6], cells [8] or compounds [9]. In these studies, various positions (diaphyseal to epiphyseal) were chosen to perform the perforation. However the precise kinetics and patterns of bone regeneration, and in particular the evaluation of cortical versus cancellous bone formation, have not been thoroughly examined and compared in homogeneous, standardized conditions. In order to provide a basis for the choice of a model enabling investigation of either cortical or cancellous bone repair, we have compared two defect models. We have drilled 0.9 diameter holes into

the diaphysis or into the distal epi-metaphysis of mouse femurs and compared the time course and morphological patterns of bone regeneration in these models.

## **Materials and Methods**

### *Mice and surgery*

C57BL/6 male mice were purchased from Charles River Laboratories. They were kept at 22-25 °C under 12 hours light/dark cycle. Food and drink was available ad libitum. Mice were operated at 14 weeks old. Anaesthesia was performed by intraperitoneous injections of ketamine hydrochloride (100 mg/kg body weight) and xylazine (4 mg/kg body weight). 0.9 mm holes were created in the femur, either in the mid-diaphysis (designed as diaphyseal defects) or in a region centred on the distal growth plate, encompassing metaphyseal and epiphyseal areas (designed as epi-metaphyseal defects). Perforations were carried out using an electric drill (Harvard Apparatus) at 10 000 rpm. The operating field was frequently irrigated with saline to avoid thermal necrosis. Holes were rinsed by injection of saline using a 1 ml syringe and a 25 Gauge needle, in order to discard bone fragments from the cavity. In the mid-diaphysis, through-and-through perforations disrupted cortex, periosteal and endosteal surfaces and extended 0.3-0.5 mm into the marrow, but the drill did not reach the opposite cortical wall (figure 1A). An additional stripping of the mid-diaphyseal periosteum was performed in one group of six mice. Periosteum was mechanically stripped by scraping the mid-diaphyseal area before drilling the hole. The absence of periosteum on scraped bone surfaces was assessed by histology and  $\mu$ CT.

The epi-metaphyseal defect spanned the distal growth plate. The perforations were 1-1.5 mm deep. In one group, the opposite cortical wall was also perforated, creating a bilateral cortical defect. These holes destroyed cancellous trabecular bone as well as the growth plate (figure 1A). Perforations did not result in significant peri-operation or post-operation fractures. To label active bone formation sites, calcein (10 mg/kg) was injected intraperitoneously 10 days after surgery and 4 days before sacrifice. At each time point, 14, 28, 56 and 90 days after surgery, 5-8 mice were sacrificed by cervical dislocation. Femurs were fixed in 4% paraformaldehyde for 24 hours at 4°C, then transferred into 70% ethanol and stored at 4°C. All studies complied with EEC directives 86/609/EEC relative to animal experiment. All protocols were approved by the regional committee of ethics.

### *X-Ray microtomography*

Femurs were scanned in an Explore Locus SP X-Ray microcomputerized tomography device (General Electric) at an isotropic resolution of 16  $\mu\text{m}$ . Reconstruction of the diaphyseal or epi-metaphyseal regions was performed following correction of rotation centre and calibration of mineral density. Bone analysis was performed using the “Advanced Bone Analysis”™ software (GE). For cancellous bone analysis, the region of interest was bordered by the defect edges and encompassed the areas containing newly formed bone, excluding the outer boundary containing compact cortical-like bone (figure 1B). For cortical analysis, the region of interest (ROI) was a 0.8 mm diameter, 0.3 mm thick cylinder positioned between the edges of the cortical defect (figure 1B). Parameters in intact cortical bone were measured from  $\mu\text{CT}$  images in ROIs of the same size and position as the ones used for the analysis of operated bones.

Thresholding of grey values was performed using the histogram tool in order to separate mineralized elements from background. Cancellous bone volume fraction (cancellous BVF), trabecular number (TbN) and thickness (TbTh) were measured in cancellous bone.

Cortical bone volume fraction (cortical BVF) and the density of mineralized tissue (TMD) were determined in the cortical gap.

For the analysis of epi-metaphyseal defects healing, grey levels corresponding to different values of TMD of newly formed bone were converted into colours.

Gap filling was quantified from one 2D longitudinal  $\mu\text{CT}$  image positioned to the central axis of the defect. Gap filling represented the ratio of the distance between the outer edge of newly formed bone and the defect bottom, (figure 1C, d2) to the depth of the perforation (figure 1C, d1).

### *Histology*

Undecalcified femurs were embedded in methylmetacrylate as described previously [17, 18]. 7  $\mu\text{m}$  thick longitudinal sections were prepared using a microtome (Leica) and tungsten carbide blades. To identify bone structures and fibrous tissue, sections were stained with Goldner trichrome [19]. To identify cartilage tissue, sections were stained with 1% alcian blue 8GX (Sigma–Aldrich) in 0.1 M HCl which stains glycosaminoglycans. Sections were mounted as previously described for fluorescence or white light observation. To control the absence of periosteal tissue after stripping, femurs were decalcified in 0,5M EDTA for 3 days, then transferred in 70% ethanol. Decalcified tissues were embedded in paraffin, and 3  $\mu\text{m}$  thick sections were stained with Hematoxylin Eosin and Saffran (HES). Sections were

observed using a Nikon Eclipse 80i microscope. Pictures were captured using a DXM 1200 C (Nikon) CCD camera.

### *Statistics*

In graphs histograms show mean and bars show the upper standard deviation. The size of each group (n) is indicated on histograms. Statistical significance of differences between data from experimental groups was tested using a non parametric Mann-Whitney test because the size of the groups was generally too small to assess normal distribution.

## **Results**

### *General facts on operated mice*

In order to investigate the effect of defect position on the bone healing process, 0.9 mm diameter holes were created either in the diaphysis or in a region centered on the distal growth plate, encompassing metaphyseal and epiphyseal areas and designed as epi-metaphyseal defects. No post-operation mortality was recorded. Post-operation fractures were observed in 1 out of 24 animals with a diaphyseal hole and 3 out of 40 animals with an epi-metaphyseal perforation. These mice were identified because either walking or hindlimb position was abnormal the day following the operation. Mice with fractured legs were sacrificed to spare pain. All the other mice were able to walk normally 18 hours after the operation.

### *Diaphyseal defect is rapidly repaired through cortical bridging even in the absence of periosteum*

14 days after surgery, mineralized trabecular-like bone was observed in the cortical gap, with sparse elements in the bone marrow (figure 2A, i). 28 days after surgery the newly deposited matrix appeared as a mature, compact cortical bone. A few mineralized elements were occasionally detected in the marrow (figures 2A, ii). Quantification of the amount of mineralized tissue within the cortical gap, assigned as “cortical bone volume fraction”, assessed the rapid deposition and mineralization of bone matrix. 28 days after surgery, this value was not significantly different from the one measured in a ROI of identical size drawn in the femur diaphysis of a sham-operated mouse (figure 2B, C). The mineral density of the filling bone was low at 14 days but reached the value of mature cortical bone at 28 days (figure 2C).

Histological analysis of the defect 14 days after surgery confirmed the presence of mineralized trabecular-like bone within the defect gap (black arrowhead), showed traces of mineralized bone in the marrow (white arrowhead) and a moderate periosteal reaction (black arrow) but did not reveal the presence of fibrous tissue (figure 2D, i). Calcein labelling (figure 2D, ii) revealed an intense bone formation activity within the cortical gap of the defect and in the periosteum. No alcian blue staining was detected, suggesting the absence of cartilage tissue (figure 2D, iii).

To check whether periosteum was involved in the filling of cortical gap, we scraped the outer side of the femur cortex before drilling the hole. Histological examination of scraped operated femurs 14 days after surgery (figure 3A) showed that whereas periosteum was present on the un-stripped contra-lateral cortex opposite to the hole (figure 3B), it was undetectable in the stripped area surrounding the gap (figure 3C). Moreover,  $\mu$ CT images showed that whereas periosteal reaction was observed in some un-stripped bones (figure 3D), it was not found in the defect area of any of the stripped femurs, but was restricted to the side opposite to the defect in some of these samples (figure 3E). Quantitative analysis showed that the amount of bone formed within the cortical gap of stripped bones was not different from the one measured in the gap of non stripped bone (figure 3F).

***Cancellous, but not cortical bone, is rapidly regenerated in epi-metaphyseal lesions.***

Epi-metaphyseal defects resulted in the disruption of cortical bone, epiphyseal and metaphyseal spongy bone, and growth plate. The growth plate was not reconstituted, even 90 days after surgery (figure 4A). 14 days after the operation, the defect borders were delineated by an envelope of mineralized bone which persisted for at least 3 months (figure 4A, white arrow). Cancellous bone invaded the cavity 14 days after surgery (figure 4A, blue) and progressively spread from the deepest region of the defect towards the cortical gap, completely filling the cavity 56 days after surgery (figure 4B).

Quantitative analysis of newly formed cancellous bone showed an accumulation of a dense network of primary bone 14 days after surgery (figure 4C). This newly formed bone was rapidly remodelled to occupy a bone volume fraction in the range of the one of native metaphyseal trabecular bone 28 days after surgery. This remodelling essentially resulted from a reduction of the number of trabeculae (figure 4C) with a modest reduction of trabecular thickness (figure 4C). These morphological parameters showed no significant evolution at 56 and 90 days. At the external boundary of the spreading cancellous bone, mineralized tissue progressively condensed to form a thin wall of more compact bone, whose mineral density

was higher than that of cancellous bone and gradually increased with time (figure 4A, green-red). This denser bone resulting from the condensation of cancellous bone progressively formed the epi-metaphyseal cortex. Quantification of the amount of mineralized bone within the cortical gap showed that mineralized tissue was hardly detected 14 days post-surgery but thereafter gradually accumulated until 56 days. However, the amount of cortical bone formed within the gap failed to reach the value of un-operated bone even 90 days after surgery (figure 4D).

Histological examination of the defect 14 days after surgery revealed the presence of fibrous tissue within and in the vicinity of the cortical gap (figure 4E, i, black arrow) and confirmed the presence of trabecular-like mineralized elements (white arrowhead) in the deepest area of the defect. The remnant intact growth plate was observed beyond the bottom of the perforation (figure 4E, i, white arrow). Bone formation, revealed by calcein deposition, was essentially located at the hypertrophic growth plate (figure 4E, ii, white arrow) and within the defect area, sparing the cortical gap and the area filled with fibrous tissue. Alcian blue stained the growth plate (figure 4E, iii, black arrow) and articular (black arrowhead) cartilage as well as fragments located around but not within the defect zone. No alcian blue staining was observed in the area of intense bone formation, suggesting that intramembranous bone formation takes place within the defect.

When epi-metaphyseal perforations disrupting both cortex sides were created, cancellous bone was occasionally observed protruding from the walls of the cavity, 14 days after surgery (figure 5A, ii). No mineralized elements were detected in most samples (figure 5A, iii) Quantification analysis showed that the bone volume fraction within a bilateral defect was lower than a unilateral defect (figure 5B). Histological analysis revealed that the cavity of bilateral defects was completely filled by an abundant fibrous tissue with sparse trabecular-like mineralized elements close to the bone marrow (data not shown).

## **Discussion.**

In this study, we compared for the first time the kinetics and patterns of bone healing in two models of bone defects disrupting femur cortex, but differing by their position along femur axis. Both models consisted in a 0.9 mm diameter unilateral through-and-through perforation of the cortex. The diaphyseal defect was centred on femur diaphysis and disrupted only the cortex wall, with a moderate scraping of bone marrow beneath the perforated area. The epi-

metaphyseal defect was centred on the growth plate and the perforation destroyed growth plate and spongy bone over half the width of the femur. These lesions did not necessitate stabilization devices, did not result in fractures and did not disturb the normal walking activity of mice. No cartilage was observed in either model within the regenerating zone at any of the analyzed stages. Although it is not possible to exclude the presence of chondrocytes at earlier stages, this absence of a cartilaginous template in the healing process is consistent with the lack of mechanical instability in these models, in contrast with most of the fracture models [6]. This also suggests that perforation of the growth plate in the epi-metaphyseal defect model did not trigger a spread of cartilage tissue nor initiate an endochondral bone formation process, in agreement with previous studies on rabbits [10, 11], mice [12] and rats [13, 14]. In summary, bone healing in both defect models occurred through intramembranous bone formation.

Beside these common points, the diaphyseal and epiphyseal defect models differ in several aspects.

In femur mid-diaphysis, cortical defects were rapidly bridged by dense compact bone, whose histological aspect and structural parameters appeared similar to those of healthy cortex as soon as 21 days after surgery. A similar kinetics and pattern of healing has been described for tibia mid-diaphyseal defects [14]. Gap bridging did not seem to be affected by the absence of periosteum. Periosteum has been described to support both chondrogenesis and osteogenesis, whereas bone marrow/endosteum support intramembraneous ossification. Furthermore, in absence of periosteum, bone healing persists [15]. These data and our observations rule out periosteum as the major source of progenitor cells in cortical bone repair. Alternatively, osteoprogenitors recruited to the healing zone may originate either from the marrow or from the endosteum. The abundance of functional osteoblasts in the endosteum of mouse femur diaphysis [16] supports the latter possibility.

Defects disrupting both cortex and spongy bone in the epi-metaphyseal region did not trigger any bone formation within the cortical gap. This absence of cortical repair may be caused by the absence of active osteoblasts in the cortex of distal femur metaphysis, in contrast with the many osteoblasts observed in diaphyseal endosteum [16]. In this lesion, bone formation was initiated at the deepest region of the defect from pre-existing trabeculae and spread towards the cortical gap. Remarkably, when the defect crossed the entire width of the femur and destroyed cortex on both sides, cancellous bone regeneration was significantly impaired, suggesting that osteoblast progenitors are recruited mainly at the defect bottom, and not along the borders of the cylindrical perforation. The trabeculae which invaded the defect 14 days after

surgery were characterized by a low mineral density and by a high number of elements. This primary bone was rapidly remodelled to reach the density and morphology of normal spongy bone. While newly formed bone spread towards the cortical gap, its outer edge condensed into a cortical-like structure. This cortical bone formation was slow and incomplete as it failed to regenerate the normal epi-metaphyseal cortex observed in normal mature bone, even 90 days after surgery. In contrast with this finding, 0.9 mm diameter cortical gaps in femur metaphysis have been reported to be completely bridged within 42 days after surgery [13]. Although comparisons between defect repair studies carried out in different laboratories should be considered with caution, the different patterns and kinetics of cortical bone repair observed in the diaphyseal, metaphyseal and epi-metaphyseal positions point out the influence of cortical defect position on the healing process and suggest the existence of a gradient of cortical healing efficiency between the epiphysis and the mid-diaphysis of long bones.

In summary, cortical healing in the diaphyseal and epi-metaphyseal defect models differ in at least two important aspects: whereas diaphyseal defect healing is rapid and essentially cortical-based, epi-metaphyseal cortical defect healing is a slow process involving the prior formation of cancellous bone and its further corticalization. These differences may result from the local availability of endosteal, marrow or bone lining osteoprogenitors that can be recruited to the healing zone.

The defect protocols reported in this paper appear as appropriate models to investigate the mechanisms of cortical versus cancellous bone repair. They could be relevant for particular bone pathologies such as tumours, dystrophies and necroses, which do not generate mechanical instability and do not trigger a cartilaginous response. The epi-metaphyseal defect offers an alternative to bone marrow ablation, which is the most commonly used model of spongy bone regeneration in mouse [17]. In this model, transient primary bone is formed in the marrow, and then degraded. Instead, in the epi-metaphyseal defect model we describe, primary bone formation is initiated from remaining trabeculae surrounding the defect cavity, and this primary bone is further remodelled to generate a network of native-like trabeculae. This model is therefore more relevant than bone marrow ablation to mimic the healing process occurring in severe trabecular bone loss. Moreover, it enables the sequential analysis of bone formation and bone remodelling within a single model. Finally, the deep cavity which is formed by the defect offers the possibility to implant and test small-size bone filling biomaterials [18].

Altogether drilled holes models are easy to set up, do not generate morbidity or mortality and offer a good reproducibility. Diaphyseal drill defects appear pertinent for the study of

spontaneous cortical healing whereas epi-metaphyseal drill defects appear as appropriate models to investigate spongy bone regeneration. Both models, which are performed in mouse, are suited for genetic studies to determine the role of particular proteins specifically in cortical or trabecular bone healing. Using the diaphyseal defect model, we have recently shown that osteopontin and bone sialoprotein played different roles in the healing of these cortical lesions [19]. These protocols are also suited for pharmacological studies. Indeed, similar models have been used to analyze the effects of statins [20] and bisphosphonates [9] on bone healing, but in these studies repair of both cortical and cancellous bone occurred, obviating the possibility to discriminate between the effects of these treatments at each bone site.

Finally, the models described in this study provide quantitative parameters to measure the effects of treatments or of genetic alterations. The amount and degree of mineralization of gap filling bone in the diaphyseal defect model, the progression of trabecular bone throughout the epimetaphyseal cavity and its structural characteristics can be used to characterize the effects of such treatments on the quantity and quality of newly formed bone.

### **Acknowledgements**

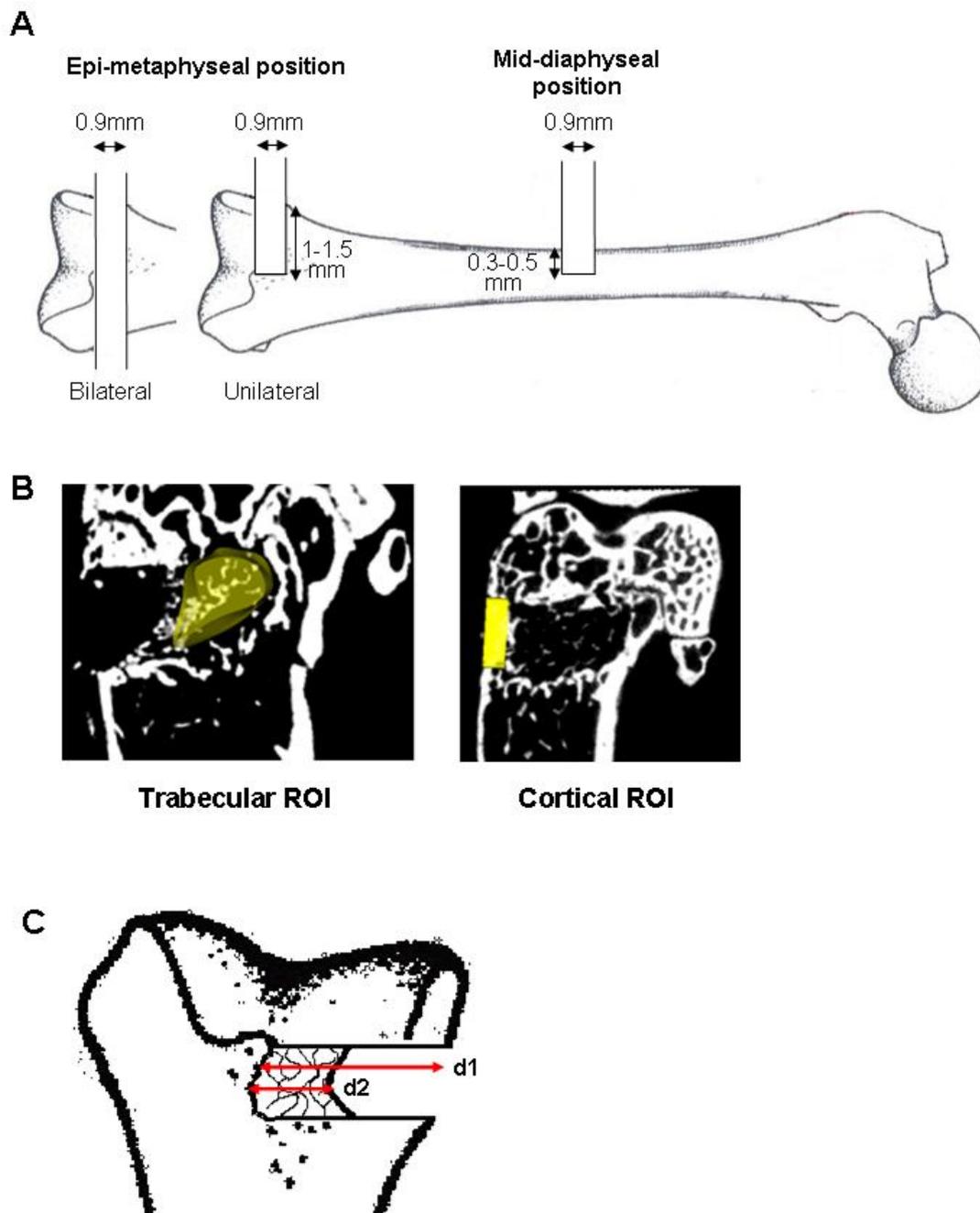
We thank Franck Simonnet from conventional animal facility of Université Bordeaux 2 for technical assistance. This work was supported by INSERM, Région Aquitaine and Université Bordeaux 2.

1. Shapiro F (2008) Bone development and its relation to fracture repair. The role of mesenchymal osteoblasts and surface osteoblasts. *Eur Cell Mater* 15:53-76
2. Alford AI, Hankenson KD (2006) Matricellular proteins: Extracellular modulators of bone development, remodeling, and regeneration. *Bone* 38:749-757
3. Schindeler A, McDonald MM, Bokko P, Little DG (2008) Bone remodeling during fracture repair: The cellular picture. *Semin Cell Dev Biol* 19:459-466
4. Choi P, Ogilvie C, Thompson Z, Miclau T, Helms JA (2004) Cellular and molecular characterization of a murine non-union model. *J Orthop Res* 22:1100-1107
5. Wahl EC, Liu L, Perrien DS, Aronson J, Hogue WR, Skinner RA, Hidestrand M, Ronis MJ, Badger TM, Lumpkin CK, Jr. (2006) A novel mouse model for the study of the inhibitory effects of chronic ethanol exposure on direct bone formation. *Alcohol* 39:159-167
6. Uusitalo H, Rantakokko J, Ahonen M, Jamsa T, Tuukkanen J, KaHari V, Vuorio E, Aro HT (2001) A metaphyseal defect model of the femur for studies of murine bone healing. *Bone* 28:423-429
7. Campbell TM, Wong WT, Mackie EJ (2003) Establishment of a model of cortical bone repair in mice. *Calcif Tissue Int* 73:49-55

8. Cui Q, Xiao Z, Li X, Saleh KJ, Balian G (2006) Use of genetically engineered bone-marrow stem cells to treat femoral defects: an experimental study. *J Bone Joint Surg Am* 88 Suppl 3:167-172
9. Nagashima M, Sakai A, Uchida S, Tanaka S, Tanaka M, Nakamura T (2005) Bisphosphonate (YM529) delays the repair of cortical bone defect after drill-hole injury by reducing terminal differentiation of osteoblasts in the mouse femur. *Bone* 36:502-511
10. Makela EA, Vainionpaa S, Vihtonen K, Mero M, Rokkanen P (1988) The effect of trauma to the lower femoral epiphyseal plate. An experimental study in rabbits. *J Bone Joint Surg Br* 70:187-191
11. Cottalorda J, Jouve JL, Bollini G, Panuel M, Guisiano B, Jimeno MT (1996) Epiphyseal distraction and centrally located bone bar: an experimental study in the rabbit. *J Pediatr Orthop* 16:664-668
12. Lee MA, Nissen TP, Otsuka NY (2000) Utilization of a murine model to investigate the molecular process of transphyseal bone formation. *J Pediatr Orthop* 20:802-806
13. Xian CJ, Zhou FH, McCarty RC, Foster BK (2004) Intramembranous ossification mechanism for bone bridge formation at the growth plate cartilage injury site. *J Orthop Res* 22:417-426
14. Zhou FH, Foster BK, Sander G, Xian CJ (2004) Expression of proinflammatory cytokines and growth factors at the injured growth plate cartilage in young rats. *Bone* 35:1307-1315
15. Colnot C (2009) Skeletal cell fate decisions within periosteum and bone marrow during bone regeneration. *J Bone Miner Res* 24:274-282
16. Bilic-Curcic I, Kalajzic Z, Wang L, Rowe DW (2005) Origins of endothelial and osteogenic cells in the subcutaneous collagen gel implant. *Bone* 37:678-687
17. Suva LJ, Seedor JG, Endo N, Quartuccio HA, Thompson DD, Bab I, Rodan GA (1993) Pattern of gene expression following rat tibial marrow ablation. *J Bone Miner Res* 8:379-388
18. Grellier M, Granja PL, Fricain JC, Bidarra SJ, Renard M, Bareille R, Bourget C, Amedee J, Barbosa MA (2009) The effect of the co-immobilization of human osteoprogenitors and endothelial cells within alginate microspheres on mineralization in a bone defect. *Biomaterials* 30:3271-3278
19. Monfoulet L, Malaval L, Aubin JE, Rittling SR, Gadeau AP, Fricain JC, Chassande O (2009) Bone sialoprotein, but not osteopontin, deficiency impairs the mineralization of regenerating bone during cortical defect healing. *Bone*
20. Ayukawa Y, Yasukawa E, Moriyama Y, Ogino Y, Wada H, Atsuta I, Koyano K (2009) Local application of statin promotes bone repair through the suppression of osteoclasts and the enhancement of osteoblasts at bone-healing sites in rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 107:336-342

## Figures & legends.

**Figure 1.** Schematic representation of the position of drilled hole in mouse femur and of the quantitative analysis of two and three-dimensional  $\mu$ CT images. A: Position of the drilled defect in mouse femur. The average depth of the holes inside the marrow is indicated. B: delineation of the regions of interest (ROI, in yellow) of newly formed cancellous bone in epi-metaphyseal defects (trabecular ROI) and ROI delineation of the cortical gap in epi-metaphyseal defects (cortical ROI). The procedure is similar for cortical ROI in diaphyseal defects. C: Schematic representation of the measurement of gap filling rate. d1 measures the depth of the perforation and d2 the distance between the defect bottom and the bone formation front.

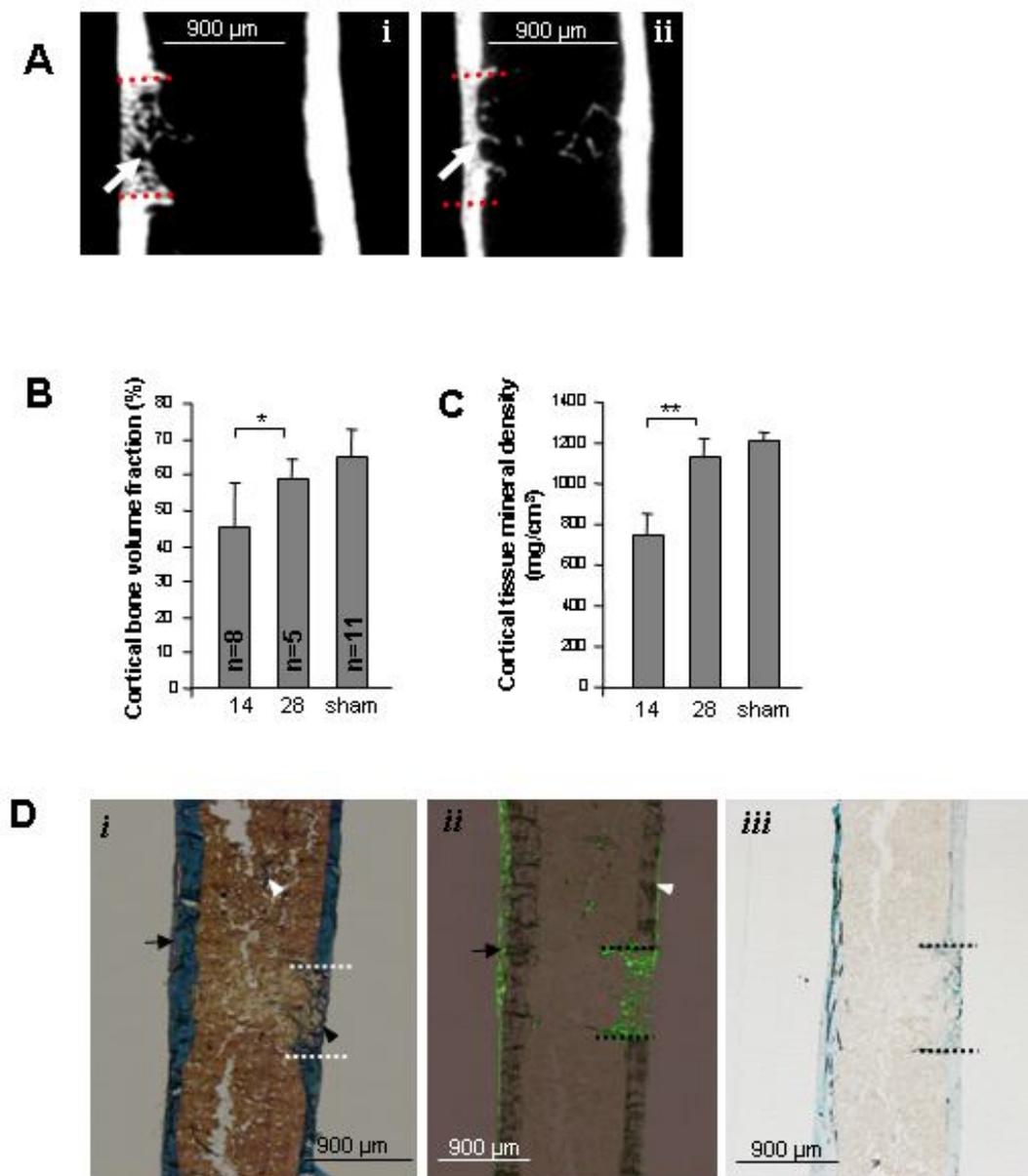


**Figure 2.** Cortical bone repair of diaphyseal defect.

A:  $\mu$ CT images at 14 days (i) and 28 days (ii) after surgery. The dotted line delimits the defect border. Arrows show newly formed mineralized bone within the cortical gap.

B and C: Quantitative analysis of diaphyseal defect healing. Measurements were performed from  $\mu$ CT images using the Advanced Bone Analysis™ software. B: Cortical bone volume fraction (%) 14 and 28 days after surgery and in sham-operated mice (sham). C: Cortical tissue mineral density (mg/cm<sup>3</sup>) 14 and 28 days after surgery and in sham-operated mice. Bars represent standard deviation. Statistical analysis was performed using Mann-Whitney U-test, \*:  $p < 0.05$ ; \*\*:  $p < 0.01$ .

D: Histological analysis of diaphyseal defects 14 days after surgery. All sections were obtained from undecalcified femurs. Dotted lines delineate the position of the cortical drilled hole. (i): Goldner trichrome staining. Black arrow: newly formed periosteal bone; Black arrowhead: newly formed woven bone within the cortical gap; white arrowhead: trabecular bone. (ii): Calcein labelling. Mice received a single injection of calcein 10 days after surgery; Black arrow: contralateral periosteal bone formation; white arrowhead: ipsilateral periosteal bone formation. (iii): Alcian Blue staining.

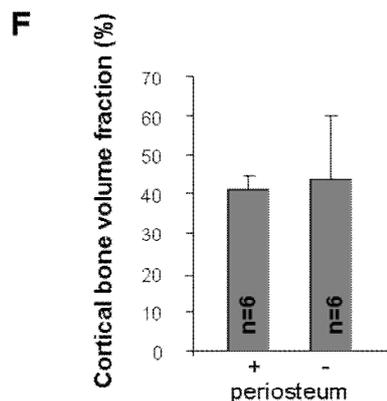
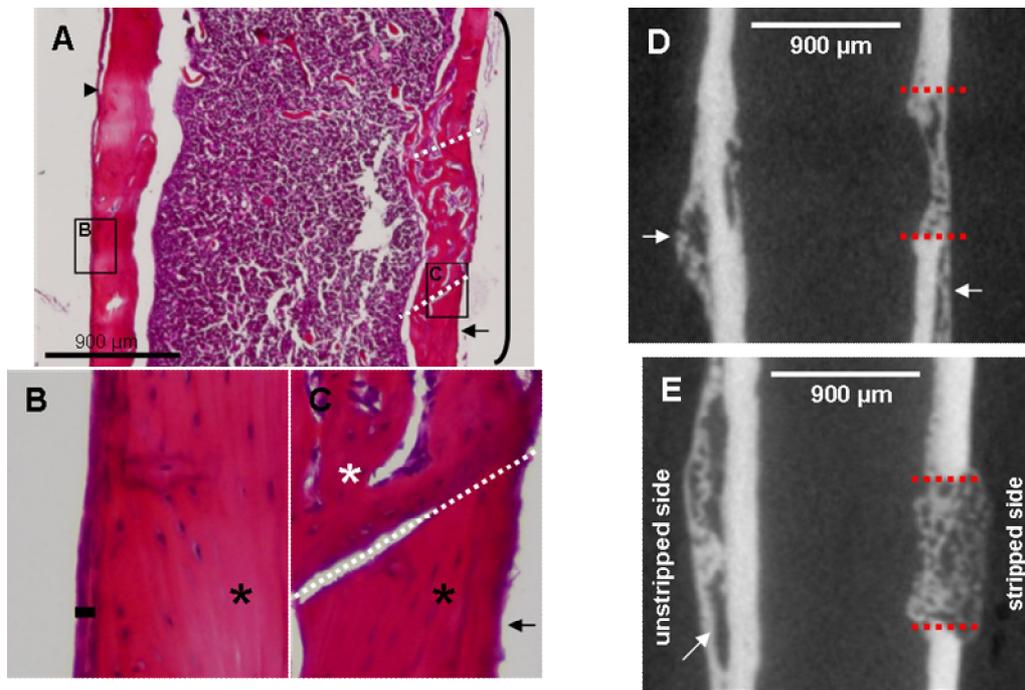


**Figure 3.** Cortical healing of bones with stripped periosteum, 14 days after surgery.

A, B, C: Histological analysis. All sections were obtained from decalcified femurs and were stained by HES. In A: White dotted lines delimit the defect border. Bracket indicates periosteum stripping area. Black arrowhead shows intact peristeum and black arrow points to the absence of periosteum in the stripped area. B and C: zoom of B and C rectangles within figure A. B: Cortical bone with an intact periosteum. Asterisk shows lamellar cortical bone. Bar indicates periosteum thickness. C: Cortical edge of a diaphyseal defect performed in a stripped femur. White dotted line delimits the defect border. Black asterisk shows lamellar cortical bone and white asterisk the newly formed bone. Black arrow indicates the lack of periosteal tissue.

D, E:  $\mu$ CT imaging of un-stripped versus stripped femurs 14 days after hole drilling. D: typical example of a periosteal reaction on the ipsi- and contra-lateral sides (arrows) of the defect in an un-stripped femur; E: periosteal reaction is observed on the contra-lateral side (arrow), but not on the ipsi-lateral side of stripped bones.

F: Quantification of cortical bone volume fraction (%) 14 days after surgery in femurs with intact (+) or stripped (-) periosteum. Analysis was performed from  $\mu$ CT images. Bars represent standard deviation. Statistical analysis was performed using Mann-Whitney U-test, \*:  $p < 0.05$ ; \*\*:  $p < 0.01$



**Figure 4:**  $\mu$ CT and histological analysis of an epi-metaphyseal defect.

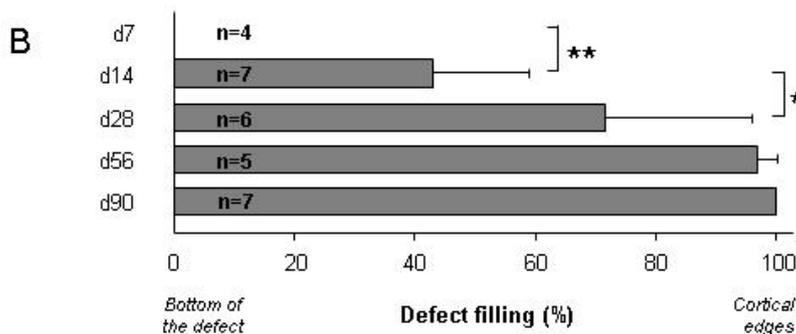
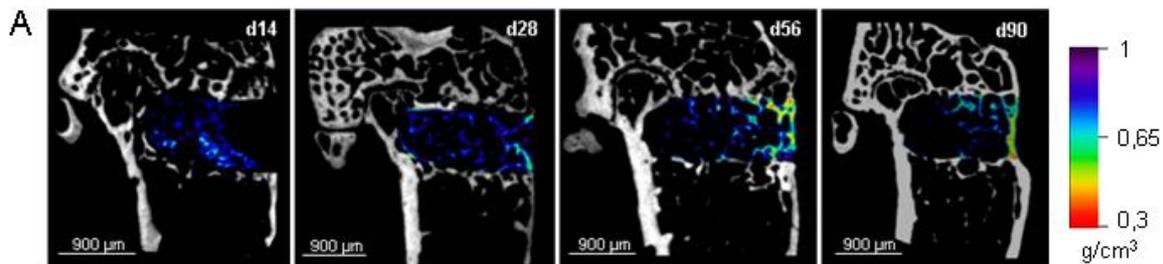
A: Mapping of the density of new bone formed at 14, 28, 56 and 90 days after surgery within the defect. Mapping was performed from  $\mu$ CT images. White arrow shows trabecular bone delineating the defect cavity. Colour scale indicates the correspondence between colours and tissue mineral density ( $\text{g}/\text{cm}^3$ ).

B: Quantification of the defect filling (%). This parameter represents the fraction of the distance between the bottom and the edge of the defect, filled with newly formed bone. Bars represent standard deviation; Statistical analysis was performed using non parametric Mann-Whitney U-test. \*:  $p < 0.05$ ; \*\*:  $p < 0.01$ .

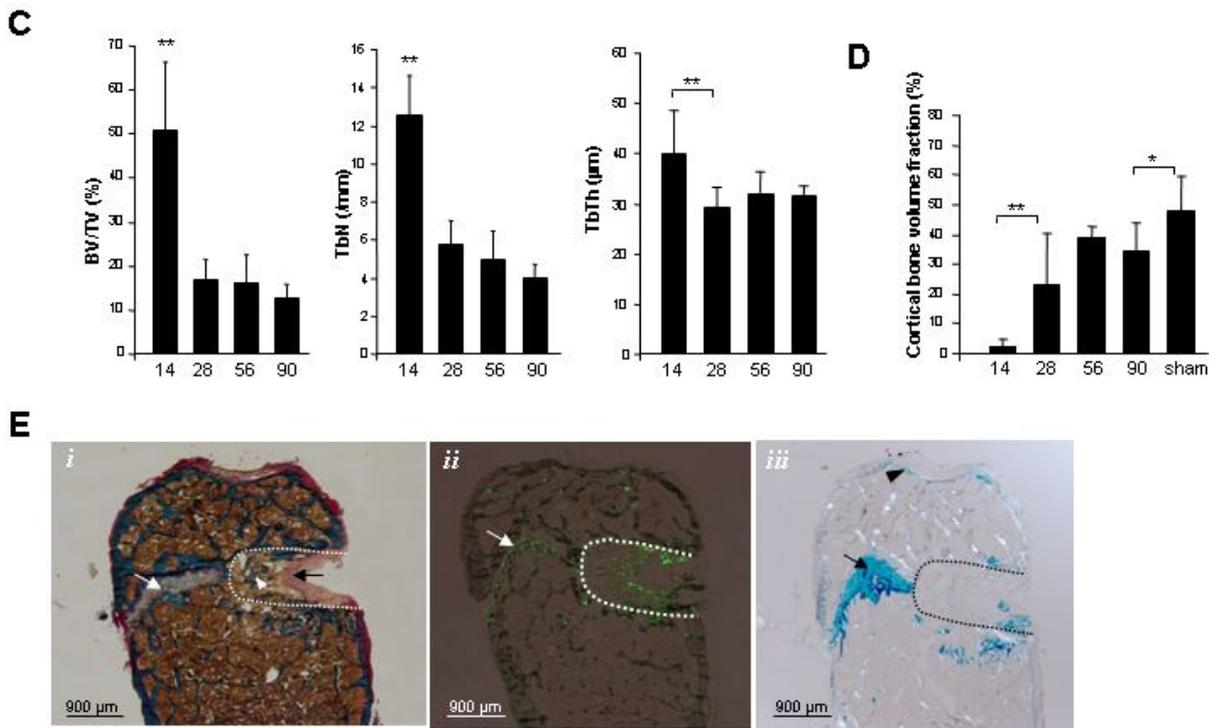
C: Quantitative analysis of cancellous bone newly formed in the cavity of the epi-metaphyseal defect. Measurements were performed from  $\mu$ CT images at 14, 28, 56 and 90 days after surgery using the Advanced Bone Analysis™ software. BV/TV (%): bone volume fraction; TbN (1/mm): trabecular number; TbTh ( $\mu\text{m}$ ): trabecular thickness.

D: Cortical bone volume fraction (%) of newly formed bone within the cortical gap. Measurements were performed 14, 28, 56 and 90 days after surgery and in a ROI positioned in a similar region in sham-operated mice (sham). Bars represent standard deviation; Statistical analysis was performed using non parametric Mann-Whitney U-test. \*:  $p < 0.05$ ; \*\*:  $p < 0.01$ .

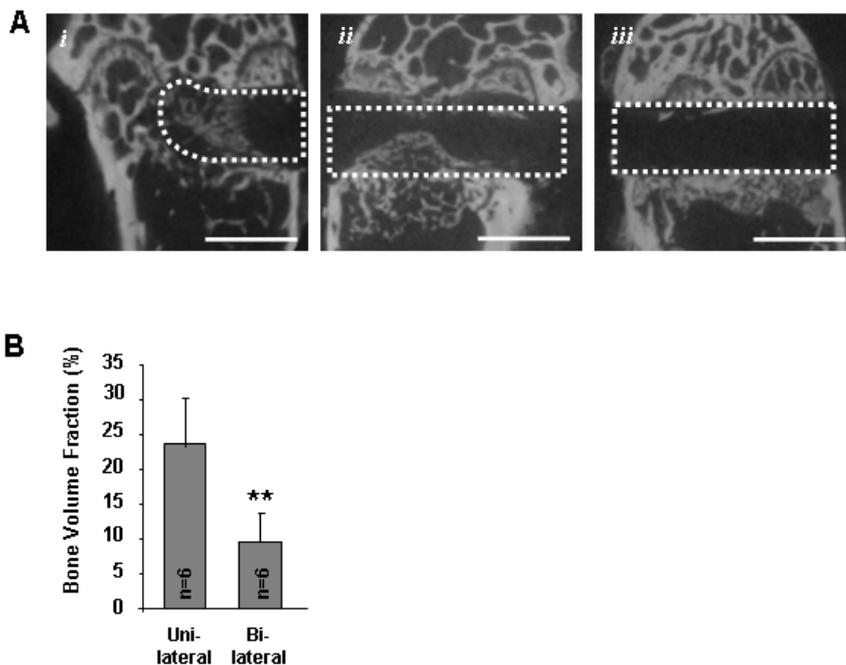
E: Histological sections of epi-metaphyseal defects 14 days after surgery. All sections were obtained from undecalcified femurs. The dotted line delimits the defect border. i: Goldner trichrome staining. Black arrow: fibrous tissue; white arrowhead: newly formed cancellous bone; white arrow: growth plate. ii: Calcein labelling. Mice received a single injection of calcein 10 days after surgery; white arrow: mineral apposition at the growth plate iii: Alcian Blue staining. Black arrow: growth plate cartilage; black arrowhead: articular cartilage.



**Figure 4 (suite)**



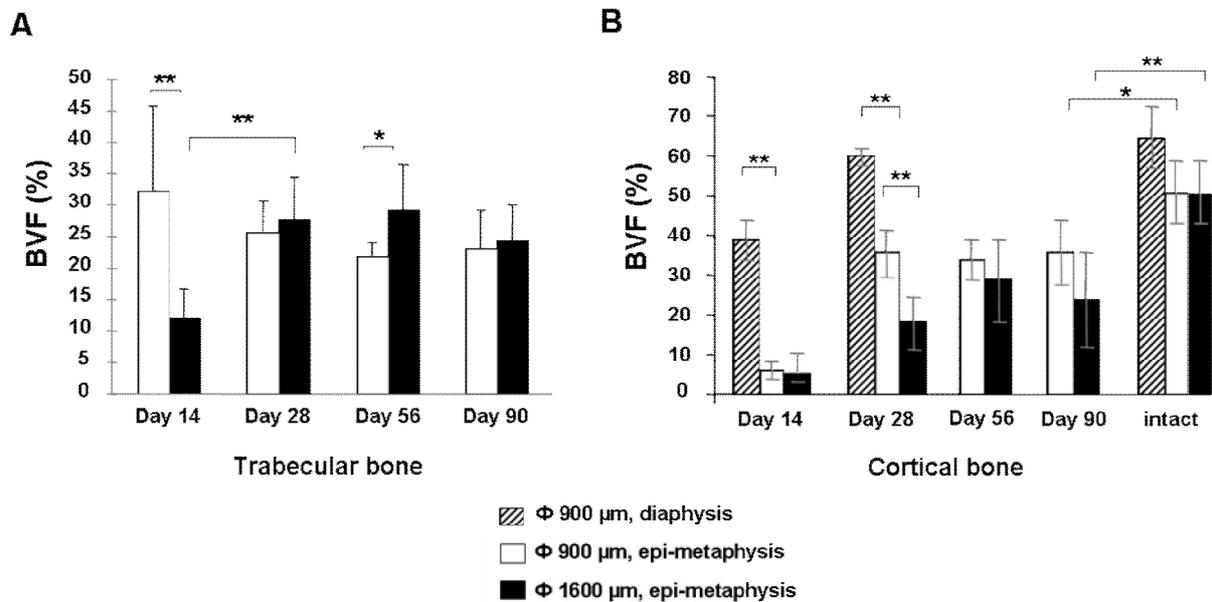
**Figure 5.**  $\mu$ CT analysis of a bilateral epi-metaphyseal defect, 14 days after surgery. A:  $\mu$ CT images of a unilateral (i) or bilateral (ii and iii) cortical perforation. ii: typical picture of a bilateral cortical defect, showing bone formation initiated from the defect walls; iii: typical picture of a bilateral cortical defect showing no mineralized elements. Bar scale represents 1 mm. (B)  $\mu$ CT quantification of the bone volume fraction of newly bone formed within the perforation. The dotted line delimits the region of interest used for the quantification. Bars represent standard deviation. Statistical analysis was performed using non parametric Mann-Whitney U-test; \*\*:  $p < 0.01$ .



### 1.3. Resultats complementaires.

Parallèlement à l'étude comparative de la cinétique et du profil de réparation des défauts diaphysaires et épi-métaphysaires de 0,9 mm de diamètre, nous avons réalisé des défauts de taille supérieure dans l'optique d'obtenir une taille critique, c'est-à-dire une taille pour laquelle la réparation de la lésion n'est pas spontanée, utilisable pour l'étude de matériaux de substitution et de comblement osseux. Ainsi, nous avons étudié la réparation d'un défaut épi-métaphysaire de 1,6 mm de diamètre. Les résultats obtenus ont été confrontés à ceux obtenus dans l'article (Figure 41, résultats personnels non soumis à publication).

Le défaut épi-métaphysaire de 1,6 mm est rapidement rempli par un os trabéculaire de faible densité qui atteint ensuite un motif et une densité proche de celle d'un os trabéculaire normal (résultats non montrés). La formation de cet os trabéculaire n'apparaît pas différente entre un défaut de 0,9 mm et 1,6 mm (Figure 41A), excepté à 14 jours quand le pourcentage du volume du défaut occupé par de l'os minéralisé est plus faible dans les défauts de 1,6 mm, probablement dû au fait qu'il faut plus de temps pour former de la matrice dans un grand volume. En comparaison avec la formation rapide d'os trabéculaire, 14 jours après la perforation, peu d'os minéralisé est formé dans la zone corticale, rempli de tissu fibreux (Figure 41B).



**Figure 41 : Quantitative analysis of Bone Volume Fraction (BVF) during defect healing.** (A) trabecular bone healing. (B) cortical bone healing. Stripped bars: diaphyseal 0.9 mm defect ; White bars: epi-metaphyseal 0.9 mm defect ; dark bars : epi-metaphyseal 1.6 mm defect. Intact: parameters of unoperated cortical bone, using the same ROI. Statistical analysis was performed using non parametric Mann-Whitney U-test. \*:  $p < 0.05$  ; \*\*:  $p < 0.01$ . (unpublished personal data)

Indépendamment du mécanisme de réparation, le défaut épi-métaphysaire se présente comme un modèle de défaut cortical critique, même pour des études de longue durée, de part l'absence de régénération de l'os cortical trois mois après la création du défaut (Figure 41B). Cependant, ce modèle reste difficile à mettre en œuvre (reproductibilité de la position de la perforation, risque de fracture).

La comparaison des processus de réparation en position diaphysaire et épi-métaphysaire met en avant l'influence majeure de la position du défaut sur la réparation osseuse corticale alors que la taille de la perforation a un effet mineur sur la réparation osseuse.

## 1.4. Conclusion

Dans le but d'identifier des modèles pertinents pour l'étude de la réparation de l'os cortical et spongieux, nous avons caractérisé et comparé la cinétique de réparation osseuse de deux défauts dans le fémur de la souris.

Les lésions ont consisté d'une part en un trou de 0,9 mm de diamètre percé de part en part du cortex diaphysaire et, d'autre part en un trou de même diamètre avec une profondeur moyenne de 1 mm dans la zone épi-métaphysaire. Les deux protocoles conduisent à la destruction de l'os cortical, avec en plus une destruction de la plaque de croissance et de l'os trabéculaire dans le modèle épi-métaphysaire. La réparation osseuse a été analysée par microtomographie aux rayons X et histologie.

Dans la diaphyse, la perforation corticale est remplie par un os primaire en deux semaines. Par ailleurs, aucun tissu minéralisé n'est observé dans la moelle osseuse en regard de la perforation. L'absence de périoste ne modifie pas la réparation de ce défaut, suggérant que les cellules ostéo-réparatrices sont recrutées de l'endoste. L'os nouvellement formé est rapidement remodelé en os compact ayant les paramètres caractéristiques d'un cortex intact après 4 semaines.

Dans l'épi-métaphyse, la formation osseuse est initiée par le fond du défaut à partir de structures osseuses pré-existantes et s'étend doucement en direction du cortex. L'os formé adopte les caractéristiques d'un os trabéculaire. En bordure extérieure de la zone de formation osseuse se forme un étroit mur cortical dont la densité osseuse augmente progressivement avec son déplacement vers la zone corticale. Toutefois, cet os ne réussit pas à combler totalement le défaut cortical épi-métaphysaire au bout de 90 jours.

Dans cette étude comparative, le modèle de défaut diaphysaire apparaît adapté à l'étude de la réparation corticale spontanée et notamment pour l'analyse des facteurs génétiques, pharmacologiques, mécaniques (voir article 2). A l'opposé, le modèle épi-métaphysaire est plus pertinent pour étudier les mécanismes cellulaires et moléculaires contrôlant la réparation de l'os trabéculaire (voir article 3). Par ailleurs, la profondeur de la cavité créée dans ce modèle permet également d'implanter et de tester de petits échantillons de matériaux cellularisés dans un microenvironnement osseux [Grellier et al. 2009]. Ce modèle présente toutefois des limites pour l'étude de biomatériaux de comblement. En effet, ce défaut n'est pas de taille critique, il se répare spontanément. De plus, il reste de taille restreinte ne permettant pas d'implanter de grand volume de matériaux.

## 2. Les protéines de la matrice extracellulaire dans la réparation de défauts osseux.

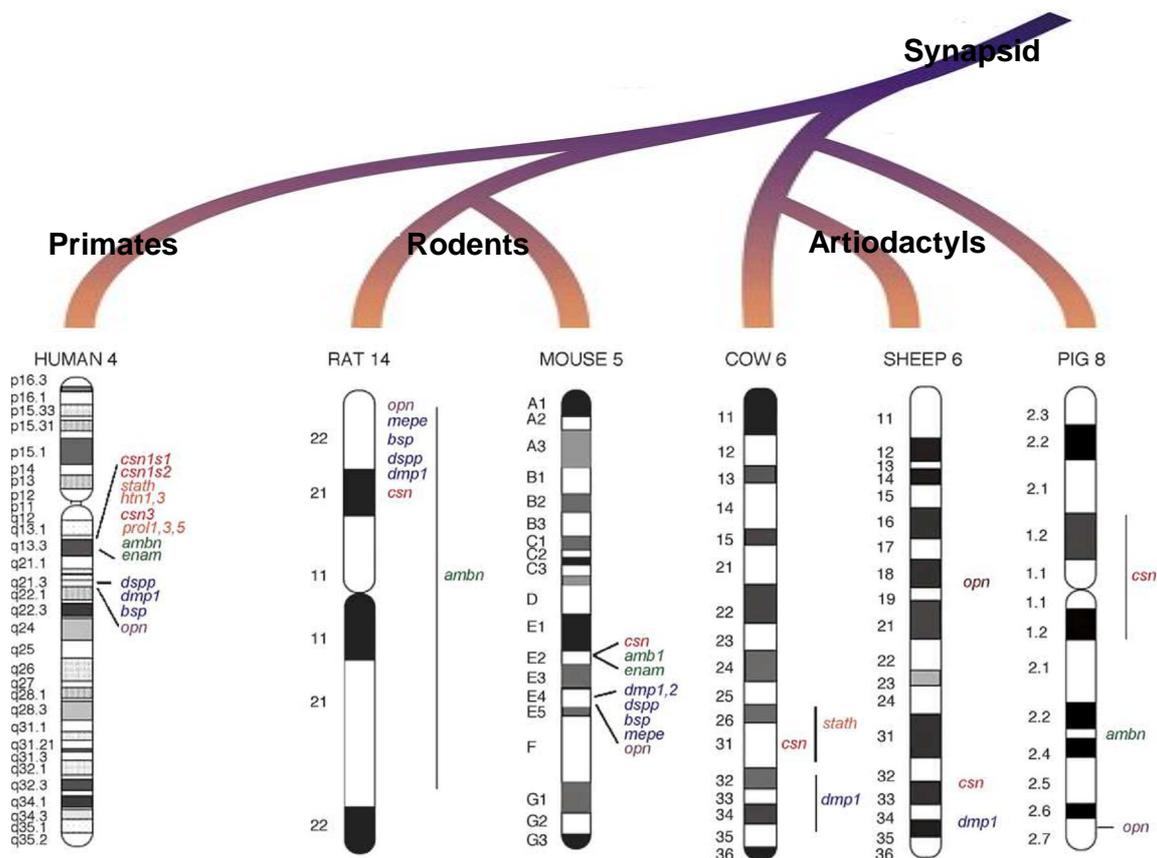
### 2.1 Introduction

La matrice extracellulaire du tissu osseux se compose d'éléments organiques sur lesquels vient se déposer une phase minérale de phosphate de calcium. Ces éléments organiques sont regroupés en deux grandes familles que sont les protéines collagéniques (majoritaires) et les protéines non collagéniques (minoritaires). Parmi ces dernières, se distingue un sous-groupe : la famille des glycoprotéines SIBLINGs.

#### 2.1.1. La famille des SIBLINGs

La famille des SIBLINGs (*Small Integrin-Binding Ligand N-linked Glycoproteins*) regroupe cinq membres : l'ostéopontine (OPN), la sialoprotéine osseuse (Bone Sialoprotein, BSP), la protéine de la dentine matricielle 1 (Dentin Matrix Protein, DMP1), MEPE (Matrix Extracellular Phosphoglycoprotein) et la sialophosphoprotéine de la dentine (Dentin SialoPhosphoProtein, DSPP). [Fisher et al. 2003]

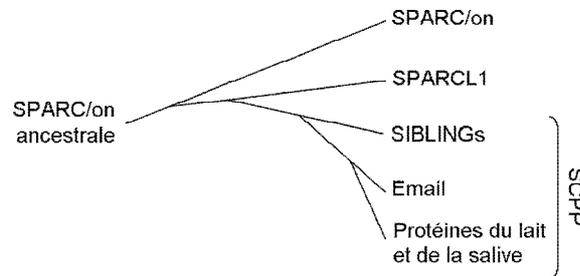
Ces protéines sont codées par des gènes alignés sur une portion du chromosome 4 chez l'homme et 5 chez la souris, au sein d'un cortège de gènes dont les produits ont un rôle dans la physiologie osseuse (Bone gene cluster) (**Figure 42**).



**Figure 42 : Synténie chromosomique du cortège de gènes d'intérêt osseux observée chez les primates (homme), les rongeurs (rat, souris) et les artiodactylés (vache, chèvre, porc).**

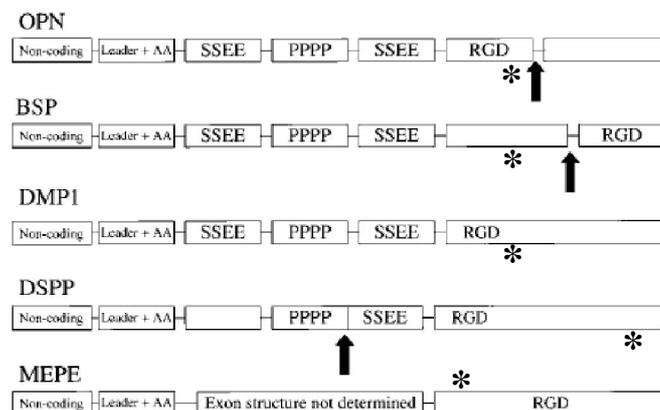
Les gènes codent pour les protéines suivantes : caséine du lait (*csn*), ostéopontine (*opn*), sialoprotéine osseuse (*bsp*), dentine matrix protein 1 (*dmp1*), dentine sialophosphoprotéine (*dspp*), ameloblastine (*ambn*) et statherine (*stath*). [Huq et al. 2005]

Par ailleurs, les travaux d'évolution moléculaire témoignent de l'origine commune des SIBLINGs, des protéines du lait (caséines), des protéines salivaires (stathérine) et des énamélines (Figure 43). [MacDougall et al. 2002; Kawasaki et al. 2004; Huq et al. 2005; Sire et al. 2005; Kawasaki et al. 2006; Kawasaki et al. 2008]



**Figure 43 : Evolution des *Secretory Calcium binding PhosphoProtein* (SCPP) à partir d'une protéine ancestrale SPARC/Ostéonectine.**  
[Malaval 2009]

La famille des SIBLINGs est caractérisée par la conservation de motifs au sein des exons (Figure 44). L'exon 1 est toujours non codant ; l'exon 2 contient la séquence d'initiation de la traduction ; l'exon 3 contient habituellement la séquence consensus de phosphorylation (SSEE) par la caséine kinase II ; l'exon 4 code pour un domaine chargé positivement riche en proline, hormis pour MEPE; l'exon 5 possède également la séquence SSEE et permet la génération de deux variants d'épissage pour OPN et DMP1. Au sein de l'un des deux derniers exons, les SIBLINGs possèdent une séquence RGD permettant la liaison aux intégrines.



**Figure 44 : Similarité des exons et des introns des gènes des SIBLINGs.**

Les flèches indiquent les positions d'introns qui ont été perdus ou ajoutés au cours de l'évolution, les astérisques indiquent la position de site de clivage par des protéases spécifiques (thrombine, métalloprotéase...). PPPP : domaine riche en proline ; SSEE : séquence consensus de phosphorylation par la caséine kinase II ; RGD : séquence tri-peptidique Asparagine-Glycine-Aspartate de liaison aux intégrines. [Fisher et al. 2001]

Les SIBLINGs sont des protéines sécrétées, riches en modifications post-traductionnelles (phosphorylation, sulfatation) [Qin et al. 2004]. La BSP, l'OPN, la DMP1 et la DSPP ont un caractère acide. Chaque protéine possède des caractéristiques propres. La BSP est riche en acide glutamique alors que l'OPN et la DSPP sont riches en acide aspartique [Fisher et al. 1983; Fisher et al. 1990; Young et al. 1990; MacDougall et al. 1997]. La DMP1 possède des domaines riches en acide glutamique et d'autres riches en acide aspartique. MEPE apparaît plus en retrait dans la famille des SIBLINGs de par son caractère non acide [Rowe et al. 2000].

Toutes ces protéines sont exprimées par les ostéoblastes, les ostéocytes, les cellules bordantes, les ostéoclastes, les chondrocytes mais également par les cellules odontoblastiques. Elles partagent toutes la capacité à se lier fortement à l'hydroxyapatite. Les travaux réalisés *in vitro* et *in vivo* ont démontré le rôle des SIBLINGs dans la nucléation et la croissance des cristaux de phosphate de calcium et dans la minéralisation de la matrice osseuse ou dentaire. Ainsi, l'OPN et MEPE inhibent la minéralisation [Hunter et al. 1996; Boskey et al. 2002; Martin et al. 2008; David et al. 2009] grâce à la présence du peptide ASARM [Rowe et al. 2004; Rowe et al. 2005], alors que la BSP, DMP1 et DSPP en sont des activateurs [Hunter et al. 1993; Hunter et al. 1996; Ye et al. 2004; Qin et al. 2007; Malaval et al. 2008; Verdelis et al. 2008; Suzuki et al. 2009]. Par ailleurs, ces protéines sont capables d'interagir avec des protéines de surfaces telles que les intégrines ( $\alpha_v\beta_3$ ,  $\alpha_v\beta_1$ ) ou encore le CD44 [Weber et al. 1996].

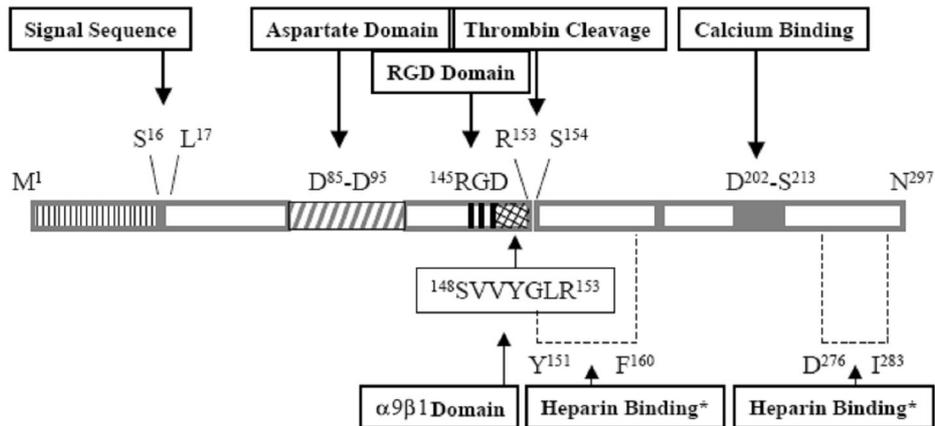
Les SIBLINGs apparaissent comme des acteurs potentiellement importants de la réparation osseuse de par : leur capacité de liaison à l'hydroxyapatite, leur implication dans la minéralisation, leur interaction avec les protéines membranaires et leur expression dans le tissu osseux. Deux protéines de cette famille ont été étudiées dans ce cadre : l'ostéopontine (OPN) et la sialoprotéine osseuse (BSP).

### 2.1.2 L'ostéopontine

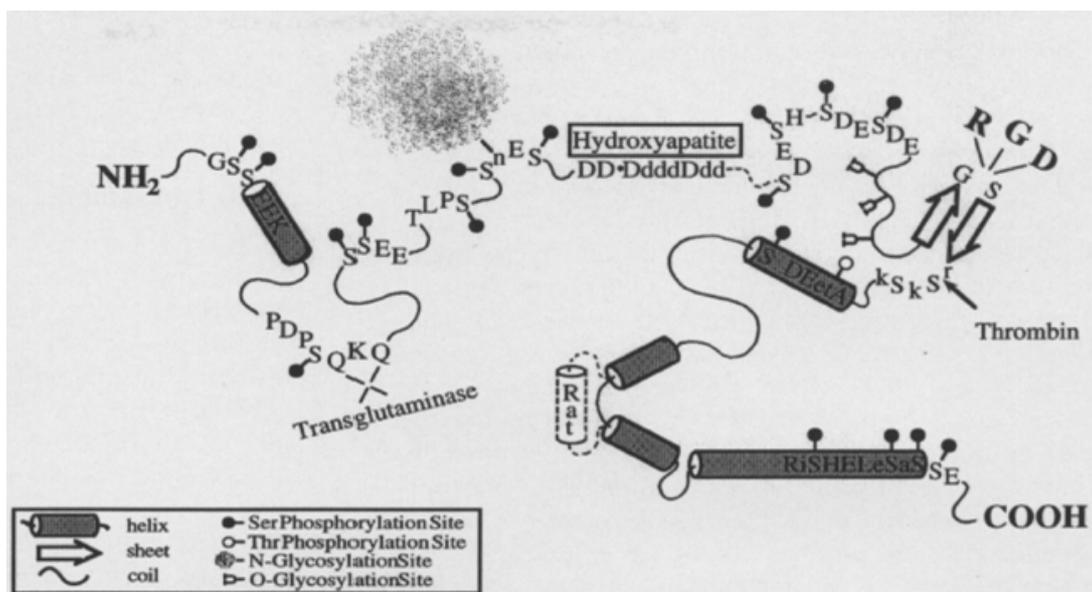
L'ostéopontine a été décrite pour la première fois par Senger comme une protéine sécrétée de 60 kDa [Senger et al. 1979]. Initialement découverte conjointement avec la BSP, l'OPN (également nommé BSP1) tire son nom de son potentiel à faire le lien entre les cellules et la phase minérale de la matrice osseuse grâce au motif RGD et à la séquence riche en acide aspartique découvert dans la séquence primaire de la protéine [Oldberg et al. 1986]. OPN fut également identifiée comme une lymphokine potentielle, produite par les lymphocytes activés et les macrophages sous le nom de Eta-1 (early T-lymphocyte activation gene 1) [Patarca et al. 1989]. Un motif d'expression plus large de la protéine a alors émergé. L'OPN fut alors nommée Secreted Phosphoprotein 1 (SSP1) reflétant la diversité de fonction de la protéine. Néanmoins, le nom d'ostéopontine a largement été retenu et gardé pour la nomenclature du gène humain [Denhardt et al. 1995].

La structure primaire de l'OPN met en évidence la présence de domaines spécifiques de clivage et de liaison aux intégrines, au calcium, à l'hydroxyapatite (Figure 45). Ces domaines sont impliqués dans les différentes fonctions physiopathologiques attribuées à l'OPN : inflammation, lactation, réponse à un stress (mécanique, biochimique, lésion tissulaire), minéralisation et processus métastatique.

**A**



**B**



**Figure 45 : Structure de l'ostéopontine.**

(A) structure primaire et (B) secondaire de l'ostéopontine, respectivement d'après [O'Regan et al. 2000] et [Sodek et al. 2000].

L'OPN est connue pour interagir avec une grande variété d'intégrines :  $\alpha_v\beta_3$ ,  $\alpha_v\beta_5$  à travers son domaine RGD [Liaw et al. 1995; Furger et al. 2003] ;  $\alpha_9\beta_1$ ,  $\alpha_4\beta_1$  grâce à la séquence SVVYGLR [Smith et al. 1996; Rangaswami et al. 2006]. Elle interagit également avec la protéine de surface CD44 [Weber et al. 1996; Teramoto et al. 2005]. A travers ces interactions avec des récepteurs de surface, l'OPN joue un rôle dans l'adhésion et la migration cellulaire. Ainsi, l'interaction de l'OPN avec les intégrines  $\alpha_v\beta_3$  des cellules du trophoctoderme porcine et les intégrines  $\alpha_v\beta_6$  des cellules épithéliales du lumen utérin permet l'adhésion et la migration des cellules du trophoctoderme au cours de l'implantation du blastocyste dans la cavité utérine [Erikson et al. 2009]. De même la surexpression de l'OPN

dans des cellules embryonnaires rénales 293 augmente leur prolifération et leur migration [Liu et al. 2009].

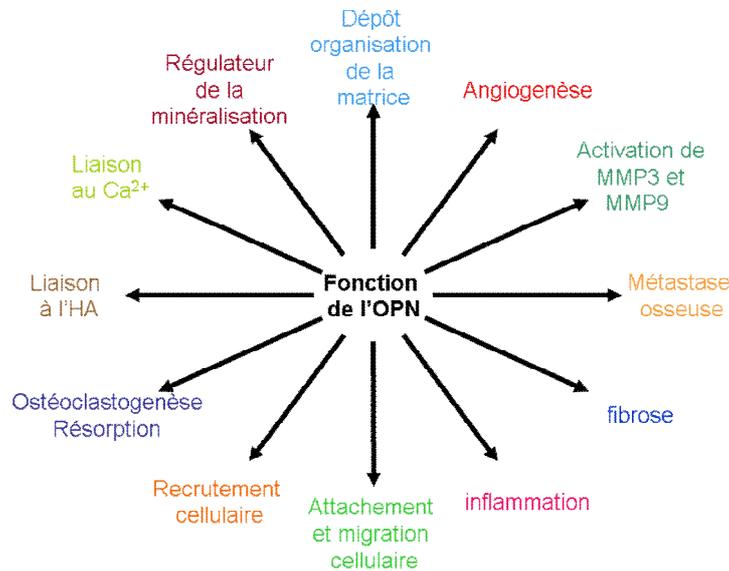
Le rôle de l'OPN au niveau cellulaire est particulièrement bien décrit dans les cancers, dans lesquels sa surexpression est corrélée à une augmentation de la migration [Hayashi et al. 2007; Chen et al. 2009; Fong et al. 2009], de l'angiogenèse [Asou et al. 2001; Ogata et al. 2007; Matusan-Ilijas et al. 2008] et de la prolifération tumorale [Behrend et al. 1994; Wu et al. 2000; Ariztia et al. 2003]. Par ailleurs, l'OPN possède la capacité de réguler différentes métalloprotéases (MMP3, MMP9 et MMP13) permettant la progression des cellules au sein des tissus [Fedarko et al. 2004; Castellano et al. 2008; Chen et al. 2009; Matsui et al. 2009]. La combinaison de l'effet activateur de l'OPN sur ces différents processus élémentaires conduit au développement de métastases et à la progression du cancer réduisant le pronostic vital [Ibrahim et al. 2000; Rangaswami et al. 2006; Bellahcene et al. 2008].

L'OPN intervient également dans d'autres processus pathologiques tels que l'inflammation, la fibrose et la réparation tissulaire. Ainsi, l'absence d'OPN induit un retard dans la réparation d'une lésion hépatique associée à une augmentation des surfaces fibrotiques [Lorena et al. 2006]. Au niveau de la réparation de la cornée, les souris OPN  $-/-$  présentent une reconstruction incomplète de la matrice induisant un retard de réparation [Miyazaki et al. 2008]. De même, la réparation d'une lésion cutanée présente une altération dans l'architecture de la matrice néo-formée en absence d'OPN [Liaw et al. 1998]. Dans les modèles murins de fibrose induite du poumon, du rein ou du cœur, la déficience en OPN entraîne une diminution de la fibrose [Persy et al. 2003; Berman et al. 2004; Graf et al. 2004; Sam et al. 2004; Mori et al. 2008]. Au niveau vasculaire, la surexpression de l'OPN est associée au développement de fibrose et de microcalcification [Canfield et al. 2002], bien que l'OPN soit connue pour son rôle inhibiteur sur la nucléation et sur la croissance des cristaux de phosphates de calcium ou d'hydroxyapatite [Hunter et al. 1994; Boskey 1996; Hunter et al. 1996; Pampena et al. 2004], ainsi que sur la minéralisation de cultures cellulaires *in vitro* [Speer et al. 2005]. Le rôle versatile de l'OPN sur la minéralisation est lié à la présence de modifications post-traductionnelles, ainsi la déphosphorylation de l'OPN induit la perte de son effet inhibiteur [Jono et al. 2000; Qin et al. 2004; Giachelli et al. 2005]. Ce rôle régulateur de la minéralisation a également été décrit *in vivo* dans le tissu osseux [Boskey et al. 2002].

Au sein de ce tissu, l'OPN joue un rôle dans le contrôle de l'activité ostéoclastique. Ainsi, elle intervient dans l'ostéoclastogenèse [Yamate et al. 1997; Aitken et al. 2004], dans le recrutement et la migration des ostéoclastes [Asou et al. 2001; Chellaiah et al. 2003] ainsi que dans le contrôle de leur activité [Contractor et al. 2005]. Nombre de ces effets découlent de l'interaction de l'OPN avec la protéine de surface CD44 et de l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  [Chellaiah et al. 2003; Chellaiah et al. 2003; Nakamura et al. 2003; Nakamura et al. 2007]. *In vivo*, la déficience en OPN chez la souris n'altère pas la résorption osseuse en condition physiologique, en revanche, elle protège de la perte de masse osseuse induite par l'ovariectomie, le traitement à la PTH ou à de forte concentration en phosphate ainsi que par la suspension de l'animal par la queue [Yoshitake et al. 1999; Ihara et al. 2001; Ishijima et al. 2006; Koyama et al. 2006]. Ces données suggèrent un rôle majeur de l'OPN sur l'activité de l'ostéoclaste et par conséquent dans la résorption osseuse lors de situations pathologiques.

Le rôle de l'OPN sur l'activité ostéoblastique et la formation osseuse reste encore mal connu. Les travaux d'Ishijima montrent qu'il n'y a pas d'altération des taux de formation osseuse chez les OPN  $-/-$  comparés au animaux OPN  $+/+$  [Kitahara et al. 2003; Ishijima et al. 2006]. *In vitro*, l'étude de la surexpression de l'OPN dans des cultures primaires d'ostéoblastes issus de moelle osseuse de rat montre que l'OPN est un activateur de la différenciation ostéoblastique et de la formation de nodules minéralisés [Kojima et al. 2004]. De façon contradictoire,

Huang et al démontre par « knock-down » de la protéine dans des pré-ostéoblastes murins MC3T3-E1 que l'OPN est un inhibiteur de la différenciation [Huang et al. 2004].



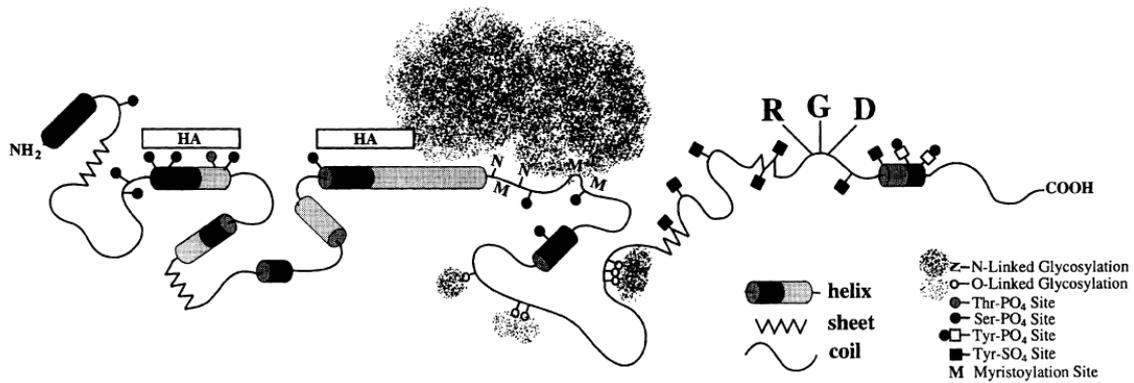
**Figure 46 : Récapitulatif des fonctions de l'OPN.**

Il est important de noter que les souris déficientes en OPN présentent un développement normal et ont une vie adulte normale. De plus, nombre des résultats décrits ci-dessus (Figure 46), montrant un effet de l'OPN, ont été obtenus par l'étude de processus pathologiques (inflammation, lésions, cancer, traitements hormonaux...). Il apparaît au vu de ces données que l'OPN est une protéine impliquée dans les processus pathologiques.

### 2.1.3. La BSP

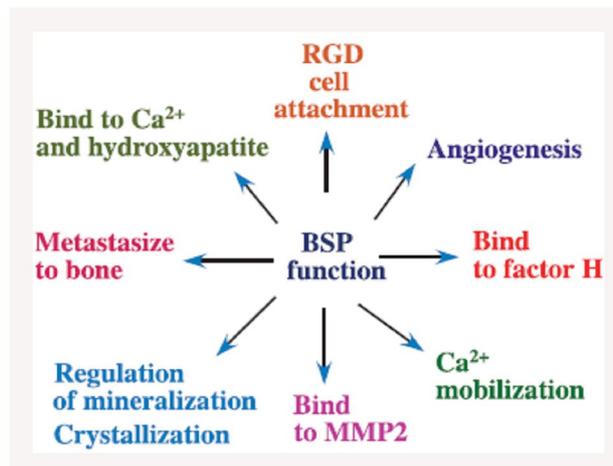
La BSP a été isolée de l'os cortical bovin en 1972 par Herring puis caractérisée par Fisher. Contrairement à l'OPN, l'expression de BSP est restreinte au tissu minéralisé (dentine, os, cartilage minéralisé et ciment).

La structure de la BSP est relativement similaire à celle de l'OPN, elle possède des domaines riches en acide aspartique permettant la liaison à l'hydroxyapatite et un peptide RGD assurant l'attachement cellulaire dépendant des intégrines (Figure 47).



**Figure 47 : Structure secondaire de la BSP.**  
[Ganss et al. 1999]

La BSP intervient dans de nombreux processus tels que l'attachement cellulaire, l'angiogenèse, la régulation de la minéralisation, le développement de métastase et la formation osseuse (Figure 48). [Hunter et al. 1993; Bellahcene et al. 1997; Bellahcene et al. 1997; Ganss et al. 1999; Bellahcene et al. 2000; Tye et al. 2003; Fedarko et al. 2004; Karadag et al. 2006; Gordon et al. 2007; Malaval et al. 2008; Gordon et al. 2009; Gordon et al. 2009; Hwang et al. 2009; Zhang et al. 2009]



**Figure 48 : Récapitulatif des fonctions de la BSP.**  
[Ogata 2008]

La BSP a tout d'abord été décrite dans les tissus minéralisés puis son expression a été découverte dans les cancers du sein [Bellahcene et al. 1994], du poumon [Bellahcene et al. 1997], de la thyroïde [Bellahcene et al. 1998] et de la prostate [Waltregny et al. 1998] qui donnent des métastases au niveau du tissu osseux.

La BSP possède la capacité d'interagir avec différentes protéines comme le facteur H, permettant ainsi de protéger les cellules cancéreuses de la lyse par le complément [Fedarko et al. 2000], ou encore la métalloprotéase MMP2 et l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  [Karadag et al. 2006]. Grâce à la présence du peptide RGD dans sa séquence, la BSP intervient dans l'attachement et la migration des cellules endothéliales humaines *in vitro*, favorisant l'angiogenèse [Bellahcene et al. 2000]. Ainsi, l'expression de la BSP dans les cancers semble promouvoir le potentiel

angiogénique et métastatique des cellules cancéreuses. De plus, leur capacité à échapper à la lyse par le complément et leur caractère invasif des cellules semblent être plus importantes quand la BSP forme à la surface des cellules un complexe avec la MMP2 et  $\alpha_v\beta_3$ . Cependant le rôle de la BSP dans le processus métastatique impliquant la MMP2 a récemment été remis en question suite aux travaux de Hwang suggérant que la BSP n'interagirait pas avec la MMP2 et ne l'activerait pas [Hwang et al. 2009].

Une forte expression de BSP dans les cellules cancéreuses notamment celles du cancer du sein [Bellahcene et al. 1997; Castronovo et al. 1998], et dans les cellules saines ostéoblastiques [Gordon et al. 2007], entraîne le dépôt de matrice minéralisée. Le rôle activateur de la BSP sur la minéralisation a été largement décrit *in vitro* par des techniques biochimiques [Hunter et al. 1993; Goldberg et al. 1996; Tye et al. 2003] ou sur des modèles cellulaires [Fujisawa et al. 1997; Midura et al. 2004; Gordon et al. 2007], et *in vivo*, il a également été rapporté dans des études réalisées sur les rongeurs [Gorski et al. 2004; Hakki et al. 2006; Wang et al. 2006; Malaval et al. 2008].

En plus d'agir sur la minéralisation du tissu osseux, la BSP participe à la régulation des activités ostéoblastiques et ostéoclastiques. Ainsi, les travaux de surexpression de la BSP par utilisation d'un vecteur adénoviral ou la supplémentation en BSP recombinante conduisent à la surexpression par les cellules MC3T3E1 de marqueurs ostéoblastiques spécifiques tels que la phosphatase alcaline ou l'ostéocalcine. A l'inverse, l'extinction de l'expression de la BSP à l'aide de shRNA provoque la diminution de l'expression de ces mêmes marqueurs, ainsi que de l'incorporation de calcéine et de la formation des nodules minéralisés, suggérant que la BSP agit comme un activateur de la différenciation ostéoblastique [Gordon et al. 2007]. Ces résultats sont concordants avec ceux obtenus lors de la différenciation de cultures primaires de cellules stromales de moelle osseuse de souris déficientes en BSP vers le lignage ostéoblastique pour lesquelles une altération de la formation des nodules minéralisés a été décrite [Malaval et al. 2008].

*In vivo*, la déficience en BSP induit chez la souris une hypominéralisation des os, une augmentation du volume osseux trabéculaire bien que la formation osseuse soit réduite et que les surfaces ostéoclastiques et le nombre d'ostéoclastes soient plus faibles [Malaval et al. 2008]. Le phénotype osseux des souris BSP<sup>-/-</sup> suggère que les deux lignages, ostéoblastiques et ostéoclastiques, sont affectés par la délétion, entraînant un renouvellement osseux plus lent. A l'inverse, les souris surexprimant la BSP présentent une diminution du volume osseux trabéculaire associée à une augmentation du nombre d'ostéoclastes, alors qu'il n'y a pas d'altération du nombre d'ostéoblastes, démontrant ainsi que la surexpression de la BSP entraîne le découplage des activités ostéoblastiques et ostéoclastiques [Valverde et al. 2008].

Ainsi, l'OPN et la BSP interviennent dans les processus élémentaires tels que l'angiogenèse, la migration et l'attachement cellulaire, les activités ostéoblastiques et ostéoclastiques, la minéralisation, le remodelage tissulaire. Ces processus sont également à la base de la réparation osseuse [Carano et al. 2003]. L'ensemble de ces données suggèrent fortement que ces deux membres de la famille des SIBLINGs pourraient avoir un rôle, parfois redondant, dans la réparation d'une lésion osseuse.

Grâce aux modèles de lésions osseuses préalablement décrits, les rôles respectifs de ces protéines sur la réparation de l'os cortical et trabéculaire ont été étudiés grâce à l'utilisation de modèle murin déficient pour ces protéines.

**2.2 Article 2 : Rôle de l'OPN et de la BSP dans la réparation d'un défaut cortical diaphysaire chez la souris**

***BSP but not OPN deficiency, impairs the mineralization of regenerating bone during cortical defect healing.***

Laurent Monfoulet<sup>1</sup>, Luc Malaval<sup>2</sup>, Aubin Jane E<sup>3</sup>, Susan R. Rittling<sup>4</sup>, Alain P Gadeau<sup>5</sup>, Jean-Christophe Fricain<sup>1</sup>, Olivier Chassande<sup>1</sup>

<sup>1</sup>INSERM, U577, Bordeaux and Université Victor Segalen Bordeaux 2, UMR-577, Bordeaux, F-33076, France

<sup>2</sup>Université de Lyon, Saint-Etienne, F42023, France; INSERM U890, Saint-Etienne, F42023, France; IFR 143, Saint-Etienne, F42023, France.

<sup>3</sup>Department of Molecular Genetics, University of Toronto, Toronto, Ontario M5S 1A8, Canada

<sup>4</sup>Department of Cytokine Biology, The Forsyth Institute, Boston, MA 02115, USA.

<sup>5</sup>INSERM, U828, Pessac, F-33604, France.

Accepté pour publication dans *Bone*

# **Bone Sialoprotein but not Osteopontin deficiency, impairs the mineralization of regenerating bone during cortical defect healing.**

Laurent Monfoulet<sup>a, b</sup>, Luc Malaval<sup>c, d</sup>, Aubin Jane E<sup>e</sup>, Susan R. Rittling<sup>f</sup>, Alain P Gadeau<sup>a, g</sup>, Jean-Christophe Fricain<sup>a, b</sup>, Olivier Chassande<sup>a, b</sup>

<sup>a</sup> Université Victor Segalen Bordeaux 2, Bordeaux, F-33076, France

<sup>b</sup> INSERM U 577, Bordeaux, F-33076, France

<sup>c</sup> INSERM U890, Saint-Etienne, F-42023, France

<sup>d</sup> Université de Lyon, Saint-Etienne, F42023, France

<sup>e</sup> Department of Molecular Genetics, University of Toronto, Toronto, Ontario M5S 1A8, Canada

<sup>f</sup> Department of Cytokine Biology, The Forsyth Institute, Boston, MA 02115, USA.

<sup>g</sup> INSERM, U828, Pessac, F-33604, France.

## **Corresponding author:**

Dr Olivier Chassande

INSERM U577, Université Victor Segalen

146 rue Léo Saignat

33076 BORDEAUX

FRANCE

Telephone : + (33) 5 57 57 17 38 / Fax : +(33) ( 56 90 05 17

Olivier.Chassande@inserm.fr

**Key words:** Osteopontin, Bone Sialoprotein, cortical defect, mineralization

## **Abstract**

Bone healing is a complex multi-step process, which depends on the position and size of the lesion, and on the mechanical stability of the wounded area. To address more specifically the mechanisms involved in cortical bone healing, we created drill-hole defects in the cortex of mouse femur, a lesion that triggers intramembranous repair, and compared the

roles of bone sialoprotein (BSP) and osteopontin (OPN), two proteins of the extracellular matrix, in the repair process. Bone regeneration was analyzed by ex-vivo micro-computerized X-ray tomography and histomorphometry of bones of BSP-deficient, OPN-deficient and wild type mice. In all mouse strains, the cortical gap was bridged with woven bone within 2 weeks and no mineralized tissue was observed in the marrow. Within 3 weeks, lamellar cortical bone filled the gap. The amount and degree of mineralization of the woven bone was not affected by OPN deficiency, but cortical bone healing was delayed in BSP-deficient mice due to delayed mineralization. Gene expression studies showed a higher amount of BSP transcripts in the repair bone of OPN deficient mice, suggesting a possible compensation of OPN function by BSP in OPN null mice. Our data suggest that BSP, but not OPN, plays a role in primary bone formation and mineralization of newly formed bone during the process of cortical bone healing.

## **Introduction**

Extracellular matrix (ECM) proteins of the SIBLING (Small Integrin-Binding LIgand, N-linked Glycoprotein) family, which includes osteopontin (OPN), bone sialoprotein (BSP), dentin matrix protein 1 (DMP1), dentin sialophosphoprotein (DSPP) and matrix extracellular phosphoglycoprotein (MEPE), are believed to play key biological roles in the development, turnover and mineralization of bone and dentin. Within this family, in vitro studies have shown that BSP and OPN (reviewed in [7, 26]) contribute to the bone resorbing activity of osteoclasts through an Arg-Gly-Asp (RGD) motif that mediates cell attachment and signaling via binding with cell-surface integrins. Both BSP and OPN are secreted by osteoblastic cells [16] and have been shown to modulate osteoblast differentiation and mineralization in vitro [8, 12, 14]. More recently, in vitro analyses have been extended to studies in mice with forced overexpression or ablation of these SIBLINGS. For example, BSP deficiency has been shown to increase trabecular bone volume, albeit with low bone formation and reduced osteoclast numbers and surfaces, resulting in reduced bone turnover and altered bone mass [16]. Vice versa, constitutive overexpression of BSP via the cytomegalovirus (CMV) promoter in mice was reported to enhance osteoclast activity and decrease osteoblast marker expression, leading to osteopenia and mild dwarfism [29]. On the other hand, OPN-deficient mice do not display obvious bone alterations under normal physiological conditions, but are resistant to

ovariectomy- and unloading-induced bone loss [13, 31]. These reported biological activities suggest that these proteins may play complex roles, especially in pathological situations which involve many cell types whose activities are tightly, temporally and spatially controlled.

Healing of bone lesions involves different processes according to the type of bone which is wounded (cortical or spongy) and to the mechanical stability of this lesion. Most clinical cases concern bone fractures, which disrupt both cortex and marrow, generating variable patterns of distraction and mechanical instability. In these instances, bone regeneration involves some level of endochondral ossification and cortical bone regeneration occurs secondarily as a slow, complex process involving cellular and molecular actors from bone marrow, periosteum, endosteum and neighbouring soft tissues origin [1, 24]. In contrast, defects consisting in holes of limited diameter through the cortex of long bones diaphysis appear as reproducible models of cortical bone healing [3, 19]. In these models, cortical gap bridging occurs rapidly via an intramembranous ossification process. OPN and BSP have a key position at the interface between cells and matrix, being coexpressed in various cell types/stages and both actively involved in bone deposition and remodelling. However their functions in bone repair remains poorly explored. OPN has been shown to play an important role in soft callus formation in a bone fracture repair model involving endochondral bone formation [6]. BSP deficiency has been shown to have complex effects in a model of metaphyseal bone repair model involving both cortical and trabecular bone destruction [15]. It is thus important to clearly establish their roles, functional specificities and degree of redundancy in the context of cortical bone repair. To this end, we used OPN- and BSP-deficient mice to elucidate the respective roles of OPN and BSP in the repair of cortical bone, using a diaphyseal trans-cortical perforation in the femur as a model. A 0.9 mm diameter hole was chosen because it has been shown to repair spontaneously without significant post-surgery fractures ([19] and our unpublished results). Because the effects of OPN deficiency have been reported in females [13, 31] and since OPN expression has been shown to be controlled by transcription factors of the estrogen receptor family [30], we reasoned that gender context could modulate the phenotype of OPN or BSP-null mice. Therefore we examined cortical defect healing in both genders.

## **Materials and Methods**

### *Mice*

OPN-deficient mice (OPN<sup>-/-</sup>) [21], BSP-deficient mice (BSP<sup>-/-</sup>) [16] and their respective wild-type littermates (C57Bl/6J OPN<sup>+/+</sup> and 129/CD-1 BSP<sup>+/+</sup>) were used in this study. They were kept at 22-25 °C under a 12 hours light/dark cycle. Food and drink were available ad libitum. Mice were operated at 19 weeks. Anaesthetization was performed by intraperitoneous injections of ketamine hydrochloride (10 mg/kg body weight) and xylazine (1 mg/kg body weight). 0.9 mm holes were created in the mid-diaphysis of the femur (identified as diaphyseal defects) by using an electric drill (Harvard Apparatus) at 10000 rpm. The operating field was frequently irrigated with saline to avoid thermal necrosis. To remove bone fragments from the cavity, drill holes were rinsed by injection of saline with a 1 ml syringe and a 25 Gauge needle. Through-and-through perforations disrupted cortex, periosteal and endosteal surfaces and extended 0.3-0.5 mm into the marrow, but the drill did not reach the opposite cortical wall. Perforations did not result in significant peri-operation or post-operation fractures. At 14 and 21 days after surgery, 6 to 11 mice were sacrificed by cervical dislocation. Femurs were fixed in 4% paraformaldehyde for 24 hours at 4°C, then transferred into 70% ethanol and stored at 4°C. 3D images of healing femurs were obtained by X-Ray micro computerized tomography ( $\mu$ CT). These images were used for the quantification of bone parameters within the healing zone. 2D histology was performed to characterise tissues within the defect. All studies complied with EEC directives 86/609/EEC relative to animal experiment. All protocols were approved by the regional committee of ethics.

### *X-Ray microtomography*

Femurs were scanned in an Explore Locus SP X-Ray microcomputerized tomography ( $\mu$ CT) device (General Electric) at an isotropic resolution of 8  $\mu$ m. Reconstruction of the diaphyseal region was performed following correction of rotation centre and calibration of mineral density. Bone analysis was performed using the “Advanced Bone Analysis”™ software (GE). For cortical analysis, the region of interest (ROI) was a 0.8mm diameter, 0.3 mm thick cylinder positioned between the edges of the cortical defect. Parameters in intact cortical bone were measured from  $\mu$ CT images in ROIs of the same size and position as the ones used for the analysis of operated bones. Thresholding of grey values was performed using the histogram tool in order to separate mineralized elements from background. Cortical bone volume fraction (cortical BVF) and the density of mineralized tissue (TMD) were determined in the cortical gap.

### *Histology and histomorphometry*

Femurs were embedded in methacrylate as described previously [23]. 7  $\mu\text{m}$  thick longitudinal sections were prepared using a Leica microtome and tungsten carbide blades. Sections were stained with Goldner's trichrome [2]. Sections were mounted as previously described for white light observation using a Nikon Eclipse 80i microscope. Pictures were generated using a DXM 1200 C (Nikon) CCD camera. Osteoid surface (Os.S/BS) and osteoid thickness (Os.Th.) were measured from Goldner's trichrome images, using the NIS-Elements Advanced Research Software (Nikon). ROIs used for quantitative analysis are indicated by dotted lines on images shown in figures.

### *Quantitative analysis of gene expression by Real Time Polymerase Chain Reaction (Q-PCR)*

Total RNA were extracted from isolated diaphysis 14 days after surgery using the RNeasy Total RNA kit (QIAGEN). One  $\mu\text{g}$  was used as template for single-strand cDNA synthesis with the Superscript preamplification system (Gibco) in a 20  $\mu\text{l}$  final volume containing 20 mM Tris-HCl pH 8.4, 50 mM KCl, 2.5 mM,  $\text{MgCl}_2$ , 0.1 mg/ml BSA, 10 mM DTT, 0.5 mM of each dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 0.5  $\mu\text{g}$  oligo(dT)12-18, and 200 U of reverse transcriptase. After incubation at 42°C for 50 min, the reaction was stopped at 70°C for 15 min. Five microliters of cDNA diluted at a 1:80 ratio were loaded in a 96-well plate. SYBR-Green Supermix® (2X iQ, BioRad) was added to the final concentration of 50 mM KCl, 20 mM Tris-HCl pH 8.4, 0.2 mM of each dNTP, 25 units / ml iTaq DNA polymerase, 3 mM  $\text{MgCl}_2$ , SYBR Green I, 10 nM fluorescein, and stabilized in sterile distilled water. Primers for amplification of alkaline phosphatase (ALP) (forward: GCC CTC CAG ATC CTG ACC AA; reverse: GCA GAG CCT GCT TGG CCT TA), OPN (forward: TCT CCT TGC GCC ACA GAA TG; reverse: TCG GTA CTG GTG TAC CTG CT) and BSP (forward: TCC ATC GAA GAA TCA AAG CA; reverse: AGT AGC GTG GCC GGT ACT TA) were used at the final concentration of 200 nM. Data were analyzed with the iCycler IQ software and compared by the  $\Delta\Delta\text{Ct}$  method. Each condition included 4 animals. Q-PCR was performed in triplicate for PCR yield validation. Results were normalized to ALP transcript amount and expressed relative to intact sham-operated bone.

### *Statistical analysis*

Statistical analysis was performed using the non-parametric Mann Whitney U-test (STATEL software). \*:  $p < 0.05$ ; \*\*:  $p < 0.01$ ; \*\*\*:  $p < 0.001$ .

## Results

### *Healing of diaphyseal cortical defect occurs through gap bridging by trabecular-like bone.*

To explore cortical bone healing, we created drill-hole trans-cortical bone defects in the mid-diaphysis of mouse femur. Fourteen days after surgery, micro-computerized X-ray images revealed the presence of trabecular-like bone in the cortical gap of wild type (OPN<sup>+/+</sup>, BSP<sup>+/+</sup>), OPN-deficient (OPN<sup>-/-</sup>) and BSP-deficient (BSP<sup>-/-</sup>) mice (Fig. 1). Mineralized woven bone was occasionally observed in the marrow cavity (Fig. 1A, arrow) and periosteal bone formation was observed in some, but not all samples (figure 1B, plain arrow), independently of the genotype. At 21 days, mineralized but immature bone continued to accumulate in the drill-hole of all groups. At 35 days, the gap was closed with mature lamellar cortical bone (data not show).

### *Bone formation within the cortical gap is mildly affected by BSP, but not OPN deficiency.*

To quantify newly formed mineralized bone during the repair process, cortical bone volume fraction (BVF) was measured in a region of interest limited to the original perforated cortical area and in sham-operated controls (see Materials and Methods). BVF was not different between OPN<sup>+/+</sup> and OPN<sup>-/-</sup> mice 14 or 21 days after surgery (Fig. 2A). However, BVF tended to be lower in both male and female BSP<sup>-/-</sup> versus BSP<sup>+/+</sup> mice at 14 days (-26% in females and -17% in males) and was significantly lower at 21 days (-25%) in BSP<sup>-/-</sup> males (Fig. 2B).

### *Mineralization of newly formed bone is impaired in BSP-deficient, but not OPN-deficient mice.*

To evaluate the degree of mineralization of repair bone, we measured the tissue mineral density (TMD) of bone deposited within the cortical gap. Between 14 and 21 days, the density of primary bone increased significantly in all groups (figure 3A and B), assessing maturation into secondary bone. No difference was found at either time between OPN<sup>+/+</sup> and OPN<sup>-/-</sup> mice (Fig. 3A). Interestingly, however, TMD of intact cortex in sham-operated femurs was slightly, but significantly higher in female and male OPN<sup>-/-</sup> mice than in OPN<sup>+/+</sup> mice (Fig. 3A). TMD of newly formed bone was significantly lower in male and female BSP<sup>-/-</sup> versus BSP<sup>+/+</sup> mice at 14 days post-surgery (Fig. 3B).

To analyse further the role of these matrix proteins in the process of osteoid tissue mineralization, we performed histomorphometry of undecalcified healing femurs 14 days

after surgery. Newly deposited bone matrix was evaluated by Goldner's trichrome staining. At this time, new bone formed within the defect was a primary bone comprising, in part, non mineralized tissue, the osteoid (in red), and mineralized bone tissue (in green), organized as a trabecular-like bone network (Fig. 4). Osteoid thickness (Os.Th.) and osteoid surface (Os.S./BS) were not affected by the lack of osteopontin (Fig. 4A). Both osteoid thickness and osteoid surface were higher (45%) in BSP<sup>-/-</sup> mice than in BSP<sup>+/+</sup> mice 14 days after surgery, the difference in osteoid surface reaching statistical significance (Fig. 4B).

In summary, OPN deficiency did not alter mineralized bone deposition within the cortical gap. Taken together, these data show that OPN is not required for matrix deposition and mineralization in the bone healing process of a diaphyseal cortical defect. In contrast, BSP deficiency delayed and altered the mineralization of repair bone, resulting in the persistence of un-mineralized osteoid matrix and to the transient accumulation of immature bone of low mineral density.

*OPN deficiency affects BSP expression but BSP deficiency does not modify OPN expression in repair bone.*

Since OPN and BSP belong to the SIBLING family of structurally related proteins, we raised the hypothesis that functional alterations resulting from one matrix protein deficiency could be masked by compensatory overexpression of the other. To challenge this hypothesis, we measured the expression of BSP and OPN gene either in intact cortex (of sham-operated mice) or in repair bone, by semi-quantitative RT-PCR. The amount of BSP or OPN transcript was reported relative to alkaline phosphatase mRNA, a marker of osteoblasts, in order to address expression of matrix protein genes specifically in these cells. Interestingly, in wild type mice, BSP and OPN transcripts were significantly less abundant (-60% and -70%, respectively) in osteoblasts from repair bone than in intact cortex (figure 5A, B). BSP was less abundant (-45%) in intact bone of OPN-deficient mice than in wild type. In contrast, the amount of BSP was strongly increased (x3.5) in repair bone of OPN<sup>-/-</sup> as compared to wild type mice (figure 5A). OPN expression was essentially unaffected by BSP deficiency. In particular, no significant difference was observed between repair bone of OPN<sup>-/-</sup> and wild type mice (figure 5B). In summary, BSP was over-expressed in repair bone of OPN null mice, whereas OPN expression appeared unaffected by BSP deficiency.

## Discussion

In this study, we compared the roles of two SIBLINGS, BSP and OPN, in the regeneration of mineralized bone within a mid-diaphysis cortical defect created in the femurs of mice with ablation of either the OPN [21] or BSP [16] gene. The model of bone healing consisted of a 0.9 mm diameter unilateral through-and-through perforation of the femur cortex, simple and geometrically easy to reproduce and quantify. The model is less complex than a fracture repair model and the lesions did not necessitate stabilization devices, did not result in fractures and did not disturb the normal walking activity of mice. Healing in this model occurred through intramembranous ossification as previously characterized in rat femur [27], as well as mouse femur [28] and tibia [3]. In all mouse strains in this study, the drilled hole defect was rapidly filled by a trabecular-like bone network which remodelled to a compact mature bone. No difference was observed between males and females in the healing patterns.

Several previous studies in cell culture models and in OPN-deficient mice have addressed potential roles for OPN in bone formation, mineralization and turnover, but much remains to be understood. OPN has been detected in newly formed bone during the healing process [9, 22], and in diaphysis, OPN transcript is expressed in both endosteal and periosteal cells [4], which are thought to participate in fracture healing [5, 25]. Adenoviral-based over-expression of OPN in cell culture models has been reported to enhance expression of osteoblast-associated differentiation markers such as osteocalcin but not to stimulate nodule formation [14]. OPN has also been shown to inhibit hydroxyapatite nucleation in vitro [12, 20] and is expressed in calcospherulites at the mineralization front of bone [17]. Nevertheless, our data suggest that OPN is not required for osteoid deposition seen in the intramembranous ossification process that occurs in the cortical drill-hole defect model. It is also possible that over-expression of BSP in OPN-null mice, which was previously reported in model of bone remodelling [13] and that we observed in cortical repair bone, compensates for the lack of OPN in the bone formation activity. Indeed, both proteins have been shown to enhance osteoblast differentiation in vitro when over-expressed in osteoprogenitor cells [8, 14]. Our data, and a previous study of the role of OPN in bone fracture healing [6], also do not support a role for OPN in the control of mineralization of primary bone. It is, however, worth mentioning that we did observe moderate, but significant, hypermineralisation of the bone cortex in both male and female OPN<sup>-/-</sup> versus OPN<sup>+/+</sup> mice. This effect may reflect the

above-mentioned role of OPN in secondary mineralization or in impairment of osteoclast activity during the maturation and remodelling of bone.

Our data on repair of drill-hole defects are in marked contrast to studies in a fracture repair model in which OPN deficiency was reported to delay the early stage of callus formation, neovascularization and late bone remodelling [6]. Major differences between the fracture model and the precisely controlled cortical defect that we used include the involvement of cartilage tissue and the origin of osteoprogenitors. Non-stabilised fractures induce high mechanical instability leading to the formation of a cartilage callus, which precedes the recruitment of osteoprogenitors and the formation of a hard callus (review in [24]). In this process, the main sources of osteoprogenitor cells are the inner layer of the periosteum and the bone marrow [5, 25]. In the present study, drilled holes did not generate substantial mechanical stress and healing occurred through intramembranous ossification, with no trace of cartilage formation [18]. In such models, osteogenic cells are thought to be recruited from the endosteum and the bone marrow [5, 18].

Our data show that the role of BSP in cortex healing is different from that of OPN. OPN expression in the repair bone is not modified by BSP deficiency, suggesting that OPN does not substitute for BSP in this model. The reduction observed in mineralized bone volume fraction and the density of mineralized tissue in BSP<sup>-/-</sup> versus BSP<sup>+/+</sup> mice 14 and 21 days after surgery is consistent with the delayed cortical repair reported in metaphyseal cortical defect healing in BSP-deficient mice [15]. Larger osteoid surfaces measured in the bridging bone of BSP<sup>-/-</sup> mice assessed delayed mineralization of the deposited matrix. This observation suggests that the lower volume fraction of mineralized bone measured in the cortical gap of these mice does not result from decreased bone matrix deposition, but from this slower mineralization rate which leads to the accumulation of un-mineralized matrix. Notably, increased osteoid surfaces have also been reported in the trabeculae of tibial metaphysis in BSP<sup>-/-</sup> mice [16]. Moreover, the lower degree of mineralization of new bone within the repairing defect of BSP<sup>-/-</sup> mice suggests that the quality of the primary mineralization of extracellular matrix is impaired in the absence of BSP. Taken together, our study shows that BSP is essential to ensure a normal rate and degree of mineralization of repair primary bone. This role is consistent with previous studies that have shown that BSP favours nucleation of hydroxyapatite crystals in vitro [10, 11] and increases bone matrix mineralization in cell culture [8]. The defect repair phenotype observed in BSP null mice was similar in males and females, suggesting that sex hormones do not interfere with the function of BSP in this model.

In conclusion, our data suggest that OPN does not play a significant or non-redundant role in cortical bone healing, whereas BSP does, apparently by its ability to control mineralization of primary bone.

### **Acknowledgements**

We thank Jérôme Guignard from INSERM U828 for technical assistance in the OPN deficient mice facility and Pierre Costet from University of Bordeaux 2 transgenic animal facility for BSP deficient animals. This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research (FRN83704 to J.E. Aubin).

### **References**

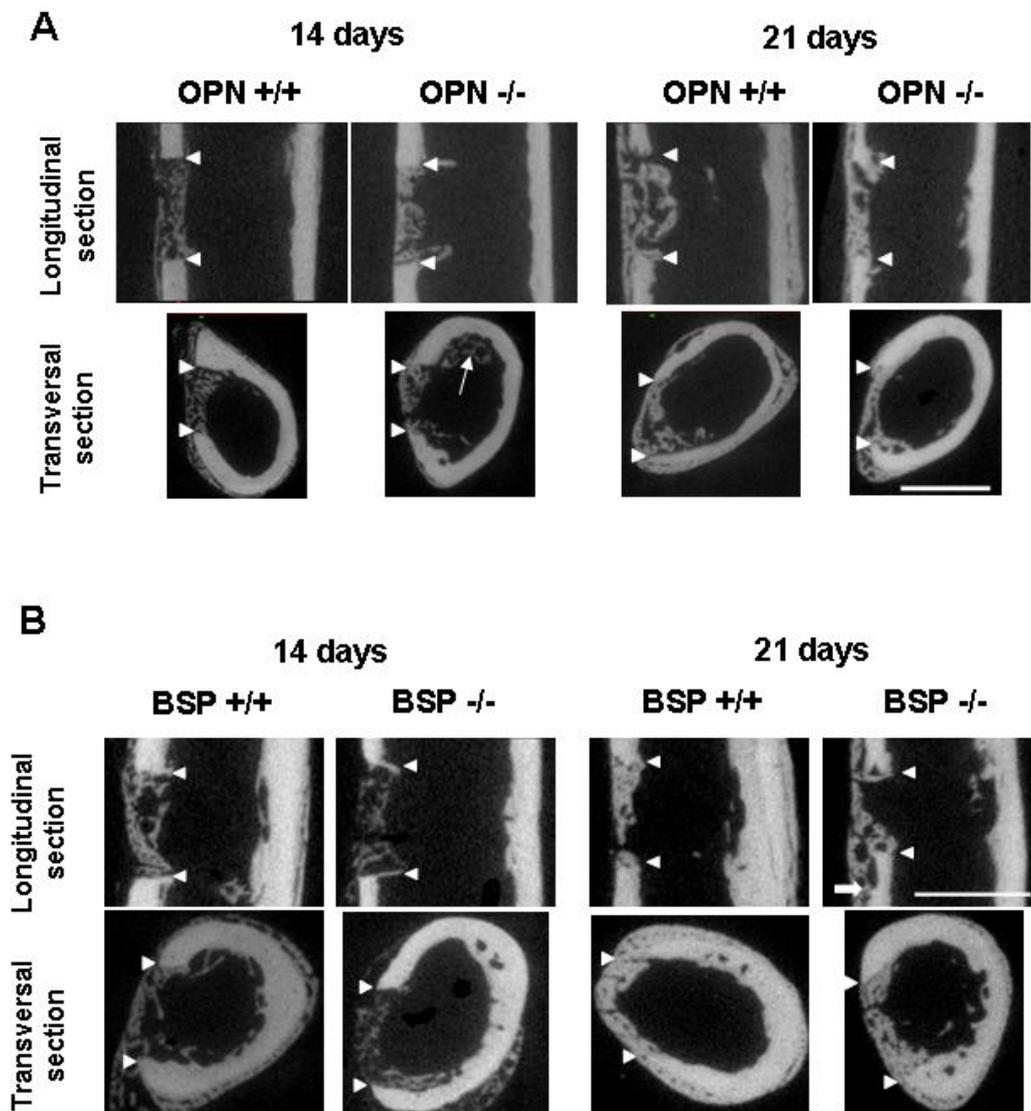
1. Alford, A. I., and Hankenson, K. D. Matricellular proteins: Extracellular modulators of bone development, remodeling, and regeneration. *Bone* 2006;38:749-57.
2. Baron, R., Virgnery, A., Neff, L., Silvergate, A., and Santa Maria, A. Processing of undecalcified bone specimens for bone histomorphometry. In: B. RR (ed.), *Bone histomorphometry : Techniques and Interpretations*, pp. 13-35: Boca Raton : CRC Press; 1983.
3. Campbell, T. M., Wong, W. T., and Mackie, E. J. Establishment of a model of cortical bone repair in mice. *Calcif Tissue Int* 2003;73:49-55.
4. Chen, J., Singh, K., Mukherjee, B. B., and Sodek, J. Developmental expression of osteopontin (OPN) mRNA in rat tissues: evidence for a role for OPN in bone formation and resorption. *Matrix* 1993;13:113-23.
5. Colnot, C. Skeletal cell fate decisions within periosteum and bone marrow during bone regeneration. *J Bone Miner Res* 2009;24:274-82.
6. Duvall, C. L., Taylor, W. R., Weiss, D., Wojtowicz, A. M., and Guldberg, R. E. Impaired angiogenesis, early callus formation, and late stage remodeling in fracture healing of osteopontin-deficient mice. *J Bone Miner Res* 2007;22:286-97.
7. Ganss, B., Kim, R. H., and Sodek, J. Bone sialoprotein. *Crit Rev Oral Biol Med* 1999;10:79-98.
8. Gordon, J. A., Tye, C. E., Sampaio, A. V., Underhill, T. M., Hunter, G. K., and Goldberg, H. A. Bone sialoprotein expression enhances osteoblast differentiation and matrix mineralization in vitro. *Bone* 2007;41:462-73.
9. Hirakawa, K., Hirota, S., Ikeda, T., Yamaguchi, A., Takemura, T., Nagoshi, J., Yoshiki, S., Suda, T., Kitamura, Y., and Nomura, S. Localization of the mRNA for bone matrix proteins during fracture healing as determined by in situ hybridization. *J Bone Miner Res* 1994;9:1551-7.
10. Hunter, G. K., and Goldberg, H. A. Nucleation of hydroxyapatite by bone sialoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90:8562-5.
11. Hunter, G. K., Hauschka, P. V., Poole, A. R., Rosenberg, L. C., and Goldberg, H. A. Nucleation and inhibition of hydroxyapatite formation by mineralized tissue proteins. *Biochem J* 1996;317 ( Pt 1):59-64.

12. Hunter, G. K., Kyle, C. L., and Goldberg, H. A. Modulation of crystal formation by bone phosphoproteins: structural specificity of the osteopontin-mediated inhibition of hydroxyapatite formation. *Biochem J* 1994;300 ( Pt 3):723-8.
13. Ishijima, M., Ezura, Y., Tsuji, K., Rittling, S. R., Kurosawa, H., Denhardt, D. T., Emi, M., Nifuji, A., and Noda, M. Osteopontin is associated with nuclear factor kappaB gene expression during tail-suspension-induced bone loss. *Exp Cell Res* 2006;312:3075-83.
14. Kojima, H., Uede, T., and Uemura, T. In vitro and in vivo effects of the overexpression of osteopontin on osteoblast differentiation using a recombinant adenoviral vector. *J Biochem* 2004;136:377-86.
15. Malaval, L., Monfoulet, L., Fabre, T., Pothuau, L., Bareille, R., Miraux, S., Thiaudiere, E., Raffard, G., Franconi, J. M., Lafage-Proust, M. H., Aubin, J. E., Vico, L., and Amedee, J. Absence of bone sialoprotein (BSP) impairs cortical defect repair in mouse long bone. *Bone* 2009.
16. Malaval, L., Wade-Gueye, N. M., Boudiffa, M., Fei, J., Zirngibl, R., Chen, F., Laroche, N., Roux, J. P., Burt-Pichat, B., Duboeuf, F., Boivin, G., Jurdic, P., Lafage-Proust, M. H., Amedee, J., Vico, L., Rossant, J., and Aubin, J. E. Bone sialoprotein plays a functional role in bone formation and osteoclastogenesis. *J Exp Med* 2008;205:1145-53.
17. Midura, R. J., Vasanji, A., Su, X., Wang, A., Midura, S. B., and Gorski, J. P. Calcospherulites isolated from the mineralization front of bone induce the mineralization of type I collagen. *Bone* 2007;41:1005-16.
18. Monfoulet, L., Rabier, B., Chassande, O., and Fricain, J. C. Drilled hole defects in mouse femur as models of intramembranous cortical and cancellous bone regeneration. *Calcif Tissue Int* 2009.
19. Nagashima, M., Sakai, A., Uchida, S., Tanaka, S., Tanaka, M., and Nakamura, T. Bisphosphonate (YM529) delays the repair of cortical bone defect after drill-hole injury by reducing terminal differentiation of osteoblasts in the mouse femur. *Bone* 2005;36:502-11.
20. Pampena, D. A., Robertson, K. A., Litvinova, O., Lajoie, G., Goldberg, H. A., and Hunter, G. K. Inhibition of hydroxyapatite formation by osteopontin phosphopeptides. *Biochem J* 2004;378:1083-7.
21. Rittling, S. R., Matsumoto, H. N., McKee, M. D., Nanci, A., An, X. R., Novick, K. E., Kowalski, A. J., Noda, M., and Denhardt, D. T. Mice lacking osteopontin show normal development and bone structure but display altered osteoclast formation in vitro. *J Bone Miner Res* 1998;13:1101-11.
22. Sato, M., Yasui, N., Nakase, T., Kawahata, H., Sugimoto, M., Hirota, S., Kitamura, Y., Nomura, S., and Ochi, T. Expression of bone matrix proteins mRNA during distraction osteogenesis. *J Bone Miner Res* 1998;13:1221-31.
23. Schenk, R. K., Olah, A. J., and Herrmann, W. Preparation of calcified tissues for light microscopy. In: G. R. Dickson (ed.), *Methods of calcified tissue preparation*, pp. 1-56. Amsterdam: Elsevier; 1984.
24. Schindeler, A., McDonald, M. M., Bokko, P., and Little, D. G. Bone remodeling during fracture repair: The cellular picture. *Semin Cell Dev Biol* 2008;19:459-66.
25. Shapiro, F. Bone development and its relation to fracture repair. The role of mesenchymal osteoblasts and surface osteoblasts. *Eur Cell Mater* 2008;15:53-76.
26. Sodek, J., Ganss, B., and McKee, M. D. Osteopontin. *Crit Rev Oral Biol Med* 2000;11:279-303.
27. Uchida, S., Doi, Y., Kudo, H., Furukawa, H., Nakamura, T., and Fujimoto, S. Transient expression of activin betaA mRNA on osteoprogenitor cells in rat bone regeneration after drill-hole injury. *Bone* 2000;27:81-90.

28. Uusitalo, H., Rantakokko, J., Ahonen, M., Jamsa, T., Tuukkanen, J., KaHari, V., Vuorio, E., and Aro, H. T. A metaphyseal defect model of the femur for studies of murine bone healing. *Bone* 2001;28:423-9.
29. Valverde, P., Zhang, J., Fix, A., Zhu, J., Ma, W., Tu, Q., and Chen, J. Overexpression of Bone Sialoprotein Leads to an Uncoupling of Bone Formation and Bone Resorption in Mice. *J Bone Miner Res* 2008.
30. Vanacker, J. M., Delmarre, C., Guo, X., and Laudet, V. Activation of the osteopontin promoter by the orphan nuclear receptor estrogen receptor related alpha. *Cell Growth Differ* 1998;9:1007-14.
31. Yoshitake, H., Rittling, S. R., Denhardt, D. T., and Noda, M. Osteopontin-deficient mice are resistant to ovariectomy-induced bone resorption. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:8156-60.

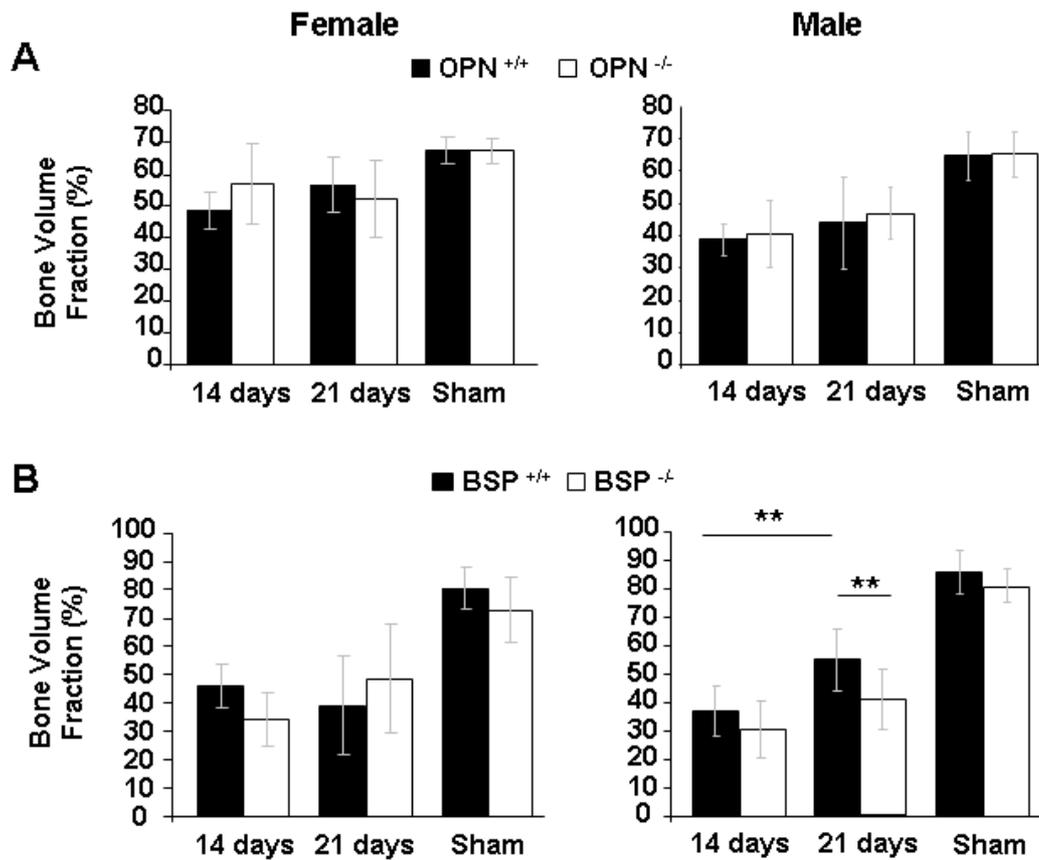
**Figure 1:**  $\mu$ CT images of diaphyseal defects in wild-type, OPN-deficient (A) and BSP deficient (B) mice.

Longitudinal and transversal sections, at 14 and 21 days after surgery in male mice. White arrowheads indicate the cortical edge of the diaphyseal defect. White arrow shows intramedullar trabecular bone. Plain white arrow shows periosteal bone. Bar scale represents 900  $\mu$ m.



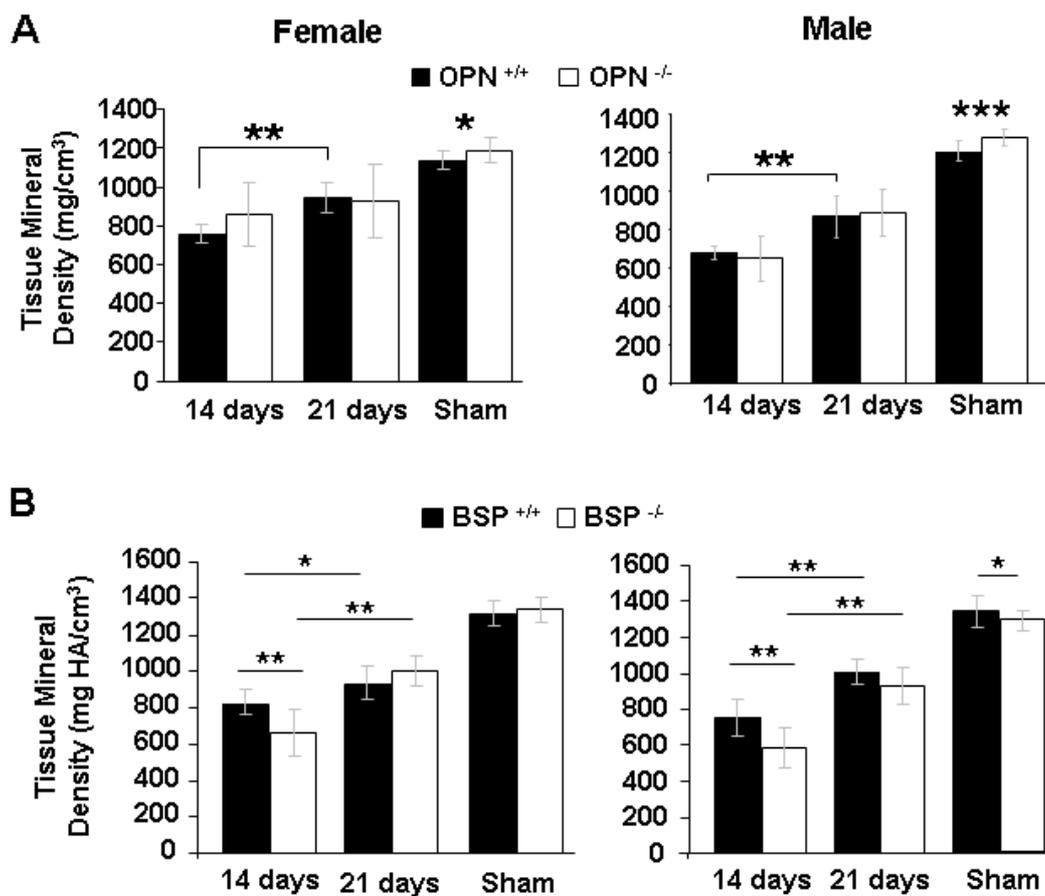
**Figure 2:** Quantification of newly formed bone within the cortical gap.

Bone volume fraction, expressed as a percentage, was measured from  $\mu$ CT images, 14 and 21 days after surgery and in sham operated mice. Analysis was performed in OPN<sup>-/-</sup> (A) and BSP<sup>-/-</sup> (B) male and female mice and in their wild type counterparts. Bars represent standard deviation. Statistical analysis were performed using Mann-Whitney U-test, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .

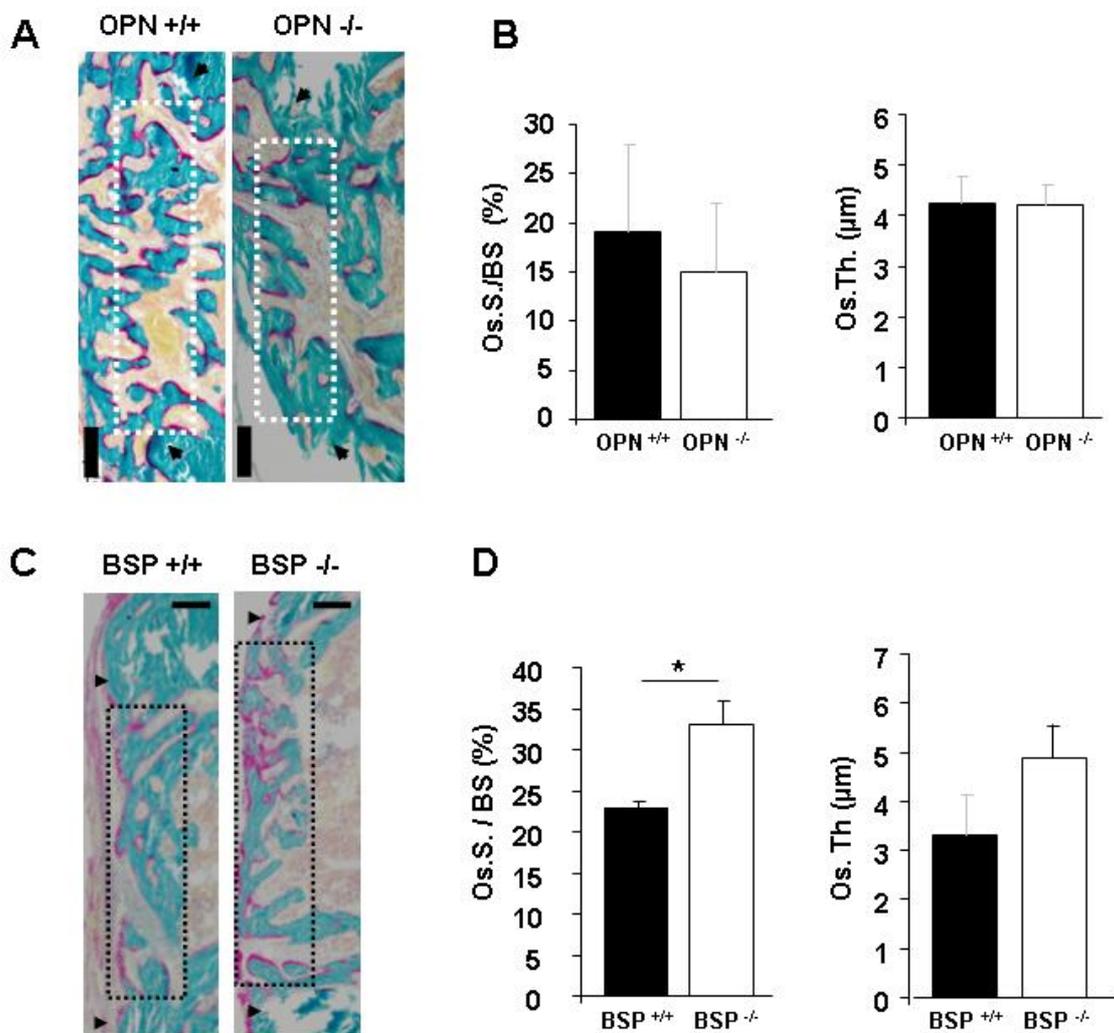


**Figure 3:** Analysis of the degree of mineralization of newly formed bone within the cortical gap

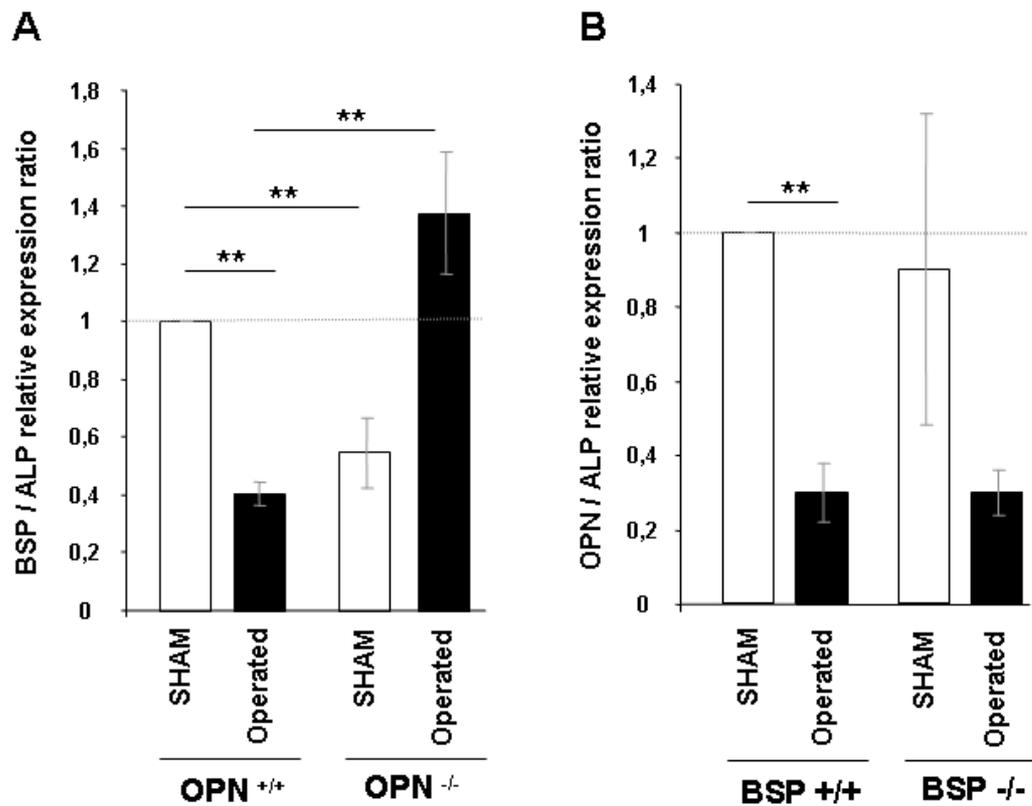
Tissue Mineral Density (mg/cm<sup>3</sup>) was measured from  $\mu$ CT images, 14 and 21 days after surgery and in sham-operated mice. Analysis was performed in OPN<sup>-/-</sup> (A) and BSP<sup>-/-</sup> (B) male and female mice and in their wild type counterparts. Bars represent standard deviation. Statistical analysis were performed using Mann-Whitney U-test, \*p<0.05, \*\*p<0.01.



**Figure 4:** Histological and histomorphometric analysis of repair bone 14 days after surgery. All transversal sections were obtained from undecalcified femurs. A, C: Goldner's trichrome staining. Dotted lines delineate the region of interest used for quantitative analysis of osteoid tissue (red). Arrowheads represent the cortical edges of the defect. Bar scale represent 100  $\mu$ m. B, D: Quantitative analysis of the osteoid surface (Os.S./BS) and osteoid thickness (Os.Th.) in OPN<sup>-/-</sup> (B) and BSP<sup>-/-</sup> (D) mice and in their wild type counterparts. Bars represent standard deviation. Statistical analysis were performed using Mann-Whitney U-test, \*p<0.05, \*\*p<0.01.



**Figure 5:** Quantitative analysis of BSP and OPN gene expression in the repair bone of wild type and mutant mice 14 days after surgery. The amounts of BSP (A) or OPN (B) transcripts are calculated relatively to the amounts of alkaline phosphatase transcripts. Results are expressed relatively to the mean value of the BSP or OPN / ALP ratio measured in the intact cortex of wild type sham-operated mice. Thus, the value reported for wild type un-operated mice is 1. Bars represent standard error of the mean (SEM). Statistical analysis were performed using Mann-Whitney U-test, \*p<0.05, \*\*p<0.01.



### **2.3 Article 3 : Rôle de l'OPN et de la BSP dans la réparation d'un défaut épimétaphysaire chez la souris.**

*Remarque : La version de l'article est une première version en attendant de résultats d'analyses histomorphométriques des ostéoclastes et d'analyses moléculaires actuellement en cours.*

#### ***OPN but not BSP deficiency, altered bone regeneration patterns in an epi-metaphyseal defect in mouse femur.***

Laurent Monfoulet<sup>1</sup>, Luc Malaval<sup>2</sup>, Aubin Jane E<sup>3</sup>, Jean-Christophe Fricain<sup>1</sup>, Olivier Chassande<sup>1</sup>

<sup>1</sup>INSERM, U577, Bordeaux and Université Victor Segalen Bordeaux 2, UMR-577, Bordeaux, F-33076, France

<sup>2</sup>Université de Lyon, Saint-Etienne, F42023, France; INSERM U890, Saint-Etienne, F42023, France; IFR 143, Saint-Etienne, F42023, France.

<sup>3</sup>Department of Molecular Genetics, University of Toronto, Toronto, Ontario M5S 1A8, Canada

# **OPN but not BSP deficiency, alters cancellous bone regeneration of a mouse epi-metaphyseal defect.**

Laurent Monfoulet<sup>a, b</sup>, Luc Malaval<sup>c, d</sup>, Aubin Jane E<sup>e</sup>, Susan R. Rittling<sup>f</sup>, Alain P Gadeau<sup>a, g</sup>, Jean-Christophe Fricain<sup>a, b</sup>, Olivier Chassande<sup>a, b</sup>

<sup>a</sup> Université Victor Segalen Bordeaux 2, Bordeaux, F-33076, France

<sup>b</sup> INSERM U 577, Bordeaux, F-33076, France

<sup>c</sup> INSERM U890, Saint-Etienne, F-42023, France

<sup>d</sup> Université de Lyon, Saint-Etienne, F42023, France

<sup>e</sup> Department of Molecular Genetics, University of Toronto, Toronto, Ontario M5S 1A8, Canada

<sup>f</sup> Department of Cytokine Biology, The Forsyth Institute, Boston, MA 02115, USA.

<sup>g</sup> INSERM, U828, Pessac, F-33604, France.

## **Corresponding author:**

Dr Olivier Chassande

INSERM U577, Université Victor Segalen

146 rue Léo Saignat

33076 BORDEAUX

FRANCE

Telephone : + (33) 5 57 57 17 38 / Fax : +(33) ( 56 90 05 17

Olivier.Chassande@inserm.fr

## **ABSTRACT**

Long bones consist of cortical and spongy bone tissue, which have different structures and physiological characteristics. Osteopontin (OPN) and Bone Sialoprotein (BSP) are extracellular matrix proteins, which have been shown to exert important functions in bone. To address the role of OPN and BSP in the repair of spongy bone, we drilled holes in the epi-metaphyseal femur of wild type or knockout mice. Bone regeneration was analyzed by ex-vivo micro-computerized X-ray tomography. The lesion destroyed the epi-metaphyseal cortex

and part of the growth plate and trabecular network. In all strains, bone formation was initiated at the bottom of the defect and progressed towards the cortical gap. The front edge of the defect condensed to form a cortical wall. In osteopontin-deficient mice, filling of the defect by trabecular bone was considerably delayed. Instead, the amount and degree of mineralization of newly formed primary bone within the filled area were higher in OPN deficient than in wild type mice. In contrast, spongy bone healing was not affected by BSP deficiency. In conclusion, our data suggest that BSP does not play a significant role in primary bone formation and mineralization during cancellous bone healing, whereas OPN is important for the spreading of regenerating bone throughout the defect.

## **Introduction**

Extracellular matrix (ECM) proteins of the SIBLING (Small Integrin-Binding LIgand, N-linked Glycoprotein) family, which includes osteopontin (OPN), bone sialoprotein (BSP), dentin matrix protein 1 (DMP1), dentin sialophosphoprotein (DSPP) and matrix extracellular phosphoglycoprotein (MEPE), are believed to play key biological roles in the development, turnover and mineralization of bone and dentin. Within this family, BSP and OPN (reviewed in [8, 24]) contribute to the bone resorbing activity of osteoclasts through an Arg-Gly-Asp (RGD) motif that mediates cell attachment and signaling via its reaction with cell-surface integrins. Both proteins are secreted by osteoblastic cells [16] and have been shown to modulate the differentiation of these cells [10, 14]. Both have also been shown to modulate the structure of mineralized matrix *in vitro* [12]. In addition, BSP may play a role in the control of bone growth [28].

More recently, *in vitro* analyses have been extended to studies in mice with forced overexpression or ablation of these SIBLINGS. For example, BSP deficiency has been shown to increase trabecular bone volume, albeit with low bone formation and reduced osteoclast numbers and surfaces, resulting in reduced bone turnover and altered bone mass [16]. Vice versa, constitutive overexpression of BSP via the cytomegalovirus (CMV) promoter in mice was reported to enhance osteoclast activity and decrease osteoblast marker expression, leading to osteopenia and mild dwarfism [28]. On the other hand, OPN-deficient mice do not display obvious bone alterations under normal physiological conditions, but are resistant to ovariectomy- and unloading-induced bone loss [13, 31]. These reported biological activities suggest that these proteins may play complex roles, especially in pathological situations

which involve many cell types whose activities are tightly, temporally and spatially controlled.

Bone healing of unstabilized fractures involves a well-characterized cascade of events that includes hematoma formation, inflammation, soft cartilage tissue formation, neovascularization, osteoblastic callus mineralization and osteoclastic remodeling of the hard callus back to lamellar bone [9]. This complex sequence is coordinated by a variety of growth factors and extracellular matrix proteins[1]. OPN and BSP have a key position at the interface between cells and matrix, being coexpressed in various cell types/stages and both actively involved in bone deposition and remodelling. It is thus important to clearly establish their roles, functional specificities and degree of redundancy in the bone repair context. We have focused this study on the respective roles of OPN and BSP in the repair of trabecular bone. We have used an epi-metaphyseal perforation as a model of trabecular bone healing. This model is less complex than the usual fracture model. The defect area is not submitted to intense mechanical stress, does not need stabilization devices and involves intramembranous bone formation [19]. We performed drilled holes in the epi-metaphyseal region of the femur of OPN- and BSP-deficient mice, and compared the trabecular bone regeneration in these strains.

## **Materials and Methods**

### *Mice*

OPN deficient mice (OPN  $-/-$ ) [22], BSP deficient mice (BSP  $-/-$ ) [16], and their respective wild-type mice (C57Bl/6J OPN  $+/+$  and 129/CD-1 BSP  $+/+$ ) were used in this study. They were kept at 22-25 °C under 12 hours light/dark cycle. Food and drink was available ad libitum. Mice were operated at 14 weeks. Anaesthesia was performed by intraperitoneous injections of ketamine hydrochloride (10 mg/kg body weight) and xylazine (1 mg/kg body weight). 0.9 mm holes were created in the femur in a region centred on the distal growth plate, encompassing metaphyseal and epiphyseal areas (designed as epi-metaphyseal defects). Perforations were carried out using an electric drill (Harvard Apparatus) at 10 000 rpm. The operating field was frequently irrigated with saline to avoid thermal necrosis. Holes were rinsed by injection of saline using a 1 ml syringe and a 25 Gauge needle, in order to discard bone fragments from the cavity. The epi-metaphyseal defect was centred on the distal growth plate. The perforations were 1-1.5 mm deep. These holes destroyed cancellous trabecular bone as well as the growth plate (figure 1). Perforations did not result in significant peri-operation or post-operation fractures. At each time points, 14, 28, 56 and 90 days after

surgery, 6 mice were sacrificed by cervical dislocation. Femurs were fixed in 4% paraformaldehyde for 24 hours at 4°C, then transferred into 70% ethanol and stored at 4°C. 3D images of healing femurs were obtained by X-Ray micro computerized tomography ( $\mu$ CT). These images were used for the quantification of bone parameters within the healing zone. 2D histology was performed to characterise tissues within the defect. All studies complied with EEC directives 86/609/EEC relative to animal experiment. All protocols were approved by the regional committee of ethics.

#### *X-Ray microtomography*

Femurs were scanned in an Explore Locus SP X-Ray microcomputerized tomography device (General Electric) at an isotropic resolution of 16  $\mu$ m. Reconstruction of the epi-metaphyseal regions was performed following correction of rotation centre and calibration of mineral density. Bone analysis was performed using the “Advanced Bone Analysis”™ software (GE). For cancellous bone analysis, the region of interest (ROI) encompassed the areas filled with newly formed bone (Figure 2). Thresholding of grey values was performed using the histogram tool in order to separate mineralized elements from background. Bone volume fraction (BV/TV), trabecular thickness (Tb.Th.,  $\mu$ m), trabecular number (Tb.N.), trabecular space (Tb.Sp.,  $\mu$ m) and the density of mineralized tissue (TMD) were determined within the ROI.

The filling gap rate represented the ratio of the bone-filled gap depth (distance between bottom and edge of the primary bone front) to the total defect depth (distance between bottom and cortical gap) and expressed as a percentage.

#### *Histology*

Femurs were decalcified in 0.5M EDTA for 3 days, then transferred in 70% ethanol. Samples were embedded in paraffin, and 3  $\mu$ m thick sections were stained with Hematoxylin Eosin and Saffran (HES). Pictures were generated using a Nikon Eclipse 80i microscope Pictures were generated using a DXM 1200 C (Nikon) CCD camera.

#### *Statistics*

Statistical analysis was performed using non-parametric Mann Whitney U-test (STATEL software). \*:  $p < 0.5$ ; \*\*:  $p < 0.01$ ; \*\*\*:  $p < 0.001$ .

## Results

### *General facts on epimetaphyseal defect healing*

To elucidate the role of OPN and BSP in trabecular bone healing, we performed perforations of 0.9 mm diameter in an epi-metaphyseal region. This defect disrupted cortical bone, epiphyseal bone, metaphyseal bone and growth plate. Seven days after the surgery, the cavity was completely filled by a fibrous tissue (data not shown). Bone regeneration pattern in this model was slow and characterized by progressively mineralized bone formation within the soft callus at 14 days after surgery. This bone formation removed the fibrous callus from the bottom of the defect (black arrow fig 3B) towards the cortical gap. Trabecular-like bone formed at this time point was an immature bone with a lower tissue mineral density than mature trabeculae (respective average of 498 mg/cm<sup>3</sup> and 640 mg/cm<sup>3</sup>). In the front of bone progression, trabecular-like bone condensed and formed a cortical like wall which spread towards the cortical edges (figure 3, 56 days). Even 90 days after surgery, growth plate was not restored (data not shown).

### *OPN deficiency alters cancellous bone regeneration in epi-metaphyseal defects.*

OPN deficient mice were used to explore the role of the OPN in cancellous bone healing. At 14 days, bone formation was restricted to an area located close to the defect bottom and consisted of trabecular-like bone (figure 4). Although bone regeneration was observed in wild type and OPN-deficient mice, the amount of primary bone appeared lower in male OPN <sup>-/-</sup> mice. Quantification of defect filling revealed a significantly lower stretched area in male OPN <sup>-/-</sup> than in OPN <sup>+/+</sup> mice (figure 5). No difference was observed between both genotypes in females.

In order to characterize the mineralized tissue deposited during the repair process, morphological parameters and tissue mineral density (TMD) of trabecular-like bone were measured in the defect area containing newly formed bone, as described in Materials & Methods. In males, trabecular bone volume (BTV) was significantly higher in OPN <sup>-/-</sup> than in OPN<sup>+/+</sup> mice, primarily resulting from a significant increase of trabecular thickness, whereas the number of bone elements (TbN) was not affected by the mutation (figure 6A). Their degree of mineralization was significantly higher in male OPN <sup>-/-</sup> mice than in OPN <sup>+/+</sup> (figure 6C). In female mice, no marked phenotype was observed. Tissue mineral density, bone volume fraction and trabecular bone parameters of new bone were not significantly different in female OPN <sup>-/-</sup> compared to OPN <sup>+/+</sup> mice (figure 6).

All these data demonstrated that OPN deficiency delayed cancellous bone repair in male, but not female mice, and that primary bone which accumulated in the repair area was more abundant and more mineralized in OPN-deficient mice.

*BSP deficiency does not impair bone regeneration in epimetaphyseal defect healing.*

The involvement of BSP in cancellous bone regeneration was also investigated using BSP deficient mice. Epi-metaphyseal defects were filled with a trabecular-like bone network 14 days after surgery, in both BSP +/+ and BSP -/- mice (figure 7A). Healing patterns in BSP -/- and BSP +/+ mice did not appear different on 2D  $\mu$ C images. Quantification of defect filling confirmed the absence of difference between wild-type and BSP-deficient mice (data not shown).

Analysis of the morphology and mineralization of trabecular-like bone formed within the drilled hole did not reveal any difference between BSP +/+ and BSP -/- mice (Figure 7B). These data suggest that bone formation and mineralization occurring during trabecular bone regeneration were not altered by the BSP deficiency.

## **Discussion**

Epi-metaphyseal defect disrupt cortical bone, trabecular bone and part of the growth plate that need to heal. As previously described [4, 19, 26, 27], bone healing in the model occurs through intramembranous ossification even for the injured growth plate [29, 32]. The pattern healing is characterized by the formation of a trabecular-like bone within the cavity. This primary bone is partly remodelled in mature trabeculae at the deep cancellous bone region, whereas it is condensed in a cortical wall at the front of the bone formation area and progress towards the cavity and bridge the cortical gap. Epi-metaphyseal defect is particularly an interesting model for the study of cancellous bone repair.

In the present work, we focused on the effect of matrix protein knock-outs on the early stage of cancellous bone regeneration. 14 days after surgery, 60-80% of the defect volume is filled with primary bone in wild type animals, and the mineral density of the newly formed structures is lower than the one of native trabeculae, confirming that this primary bone has not been remodelled to mature trabecular bone. At this time, the external part of the defect, which does not contain any mineralized elements, is filled with fibrous tissue. Bone formation occurred in all mouse strains, independently of their genotype.

OPN deficiency impaired cancellous bone regeneration in male mice. In OPN<sup>-/-</sup> mice, primary bone accumulated at the bottom of the defect, but spreading of newly formed bone throughout the defect was blunted. Trabecular thickness of newly formed trabeculae was higher in OPN<sup>-/-</sup> mice, resulting in a higher bone volume fraction. These data suggest that OPN deficiency could favour bone matrix deposition by osteoblasts. A similar increase in bone volume fraction and trabecular thickness has been described in the tibia metaphysis of OPN<sup>-/-</sup> mice [5]. Surprisingly however, no alteration of osteoblast or osteoclast activity has been reported in adult OPN<sup>-/-</sup> mice at baseline [5, 13], suggesting that OPN may affect primary bone formation, but not bone remodelling [18]. However the absence an apparent phenotype in cortical bone repair in OPN<sup>-/-</sup> mice, suggests that OPN does not play a major role in initial bone formation by osteoblasts in these pathological models.

We show in this study that OPN deficiency increased the mineral density of regenerating trabecular bone. We have previously shown that native cortical bone has a higher mineral density in adult OPN-deficient mice [18]. The role of OPN in the control of bone matrix mineralization is well-documented. OPN has been shown to inhibit hydroxyapatite nucleation in vitro [11, 20] and to be expressed in calcospherulites at the mineralization front of bone [17]. Our new data showing that OPN deficiency increases mineralization in regenerating cancellous bone is consistent with the inhibitory action of OPN on mineralization initiation [3].

The major alteration of cancellous bone regeneration induced by OPN deficiency was the impairment of primary bone spreading through the defect in OPN<sup>-/-</sup> mice, strongly suggesting that OPN is involved in the progression of the bone formation front. Whether OPN stimulates the resorption of the fibrous tissue which fills the defect early after surgery [18], or whether it is important for osteoblast recruitment to the bone formation front remains to be elucidated. OPN has been shown to be involved in cell migration and cell recruitment in different models [2, 21] and in matrix remodelling [6, 22]. In cancer, OPN was demonstrated to bind and activate matrix metalloprotease, like the MMP3, involved in matrix degradation and cell migration [7]. Such mechanisms may be involved in the progression of the healing front through the defect during cancellous bone regeneration.

The role of BSP in spongy bone repair was also investigated and surprisingly, BSP deficiency did not alter cancellous bone regeneration. Our results contrast with the impaired trabecular bone healing phenotype of a metaphyseal defect in BSP<sup>-/-</sup> mice [15]. In this study, the metaphyseal defect disrupted cortical and trabecular bone but did not disrupt the growth plate. They demonstrated that BSP deficiency induced successively and transiently a decrease

and an increase in trabecular bone volume fraction, as a consequence of impaired osteoblast and osteoclast recruitment. It is not clear, however, whether in this model bone regeneration starts from the bottom of the defect from pre-existing elements as in epi-metaphyseal defects, or whether it occurs within the bone marrow as in bone marrow ablation models [23, 25, 30]. Different mechanisms of osteoblast recruitment may be involved in the two models, accounting for the discrepancies observed between the patterns observed in both models.

In conclusion, no redundancy was observed between OPN and BSP in lesion- induced bone formation [18]. This study shows that BSP does not play a significant role in primary bone formation and mineralization during cancellous bone healing. Other siblings may compensate for BSP deficiency in this model. In contrast, OPN appears as an important factor for the spreading of regenerating bone throughout the defect during cancellous bone healing.

### **Acknowledgements**

We thank Jérôme Guignard from INSERM U828 for technical assistance in the OPN deficient mice facility and Pierre Costet from University of Bordeaux 2 transgenic animal facility for BSP deficient animals. This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research (FRN83704 to J.E. Aubin).

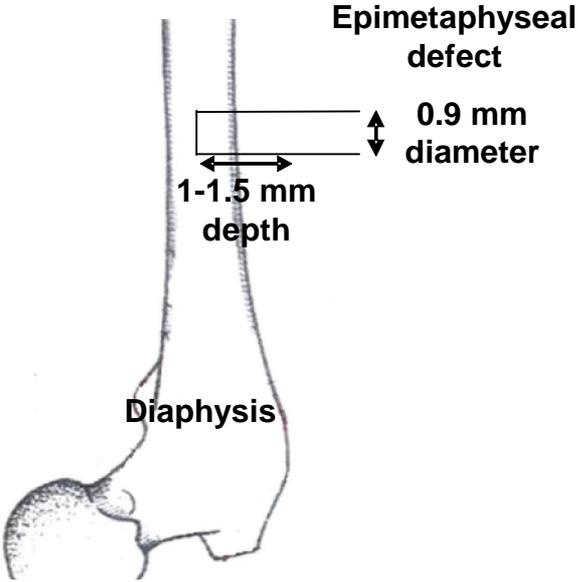
### **References**

1. Alford, A. I., and Hankenson, K. D. Matricellular proteins: Extracellular modulators of bone development, remodeling, and regeneration. *Bone* 2006;38:749-57.
2. Asou, Y., Rittling, S. R., Yoshitake, H., Tsuji, K., Shinomiya, K., Nifuji, A., Denhardt, D. T., and Noda, M. Osteopontin facilitates angiogenesis, accumulation of osteoclasts, and resorption in ectopic bone. *Endocrinology* 2001;142:1325-32.
3. Boskey, A. L., Spevak, L., Paschalis, E., Doty, S. B., and McKee, M. D. Osteopontin deficiency increases mineral content and mineral crystallinity in mouse bone. *Calcif Tissue Int* 2002;71:145-54.
4. Charnley, J., and Baker, S. L. Compression arthrodesis of the knee; a clinical and histological study. *J Bone Joint Surg Br* 1952;34-B:187-99.
5. Chellaiah, M. A., Kizer, N., Biswas, R., Alvarez, U., Strauss-Schoenberger, J., Rifas, L., Rittling, S. R., Denhardt, D. T., and Hruska, K. A. Osteopontin deficiency produces osteoclast dysfunction due to reduced CD44 surface expression. *Mol Biol Cell* 2003;14:173-89.
6. Duvall, C. L., Taylor, W. R., Weiss, D., Wojtowicz, A. M., and Guldberg, R. E. Impaired angiogenesis, early callus formation, and late stage remodeling in fracture healing of osteopontin-deficient mice. *J Bone Miner Res* 2007;22:286-97.
7. Fedarko, N. S., Jain, A., Karadag, A., and Fisher, L. W. Three small integrin binding ligand N-linked glycoproteins (SIBLINGs) bind and activate specific matrix metalloproteinases. *Faseb J* 2004;18:734-6.

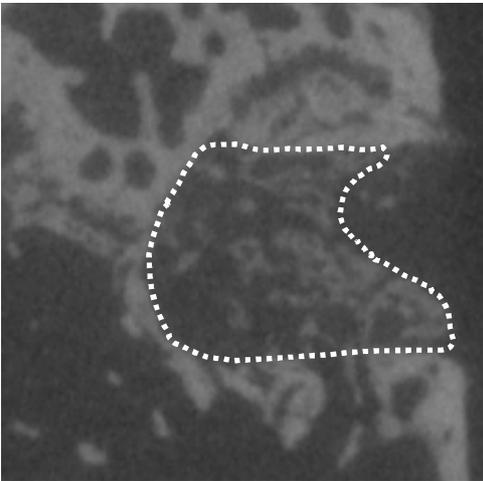
8. Ganss, B., Kim, R. H., and Sodek, J. Bone sialoprotein. *Crit Rev Oral Biol Med* 1999;10:79-98.
9. Gerstenfeld, L. C., Cullinane, D. M., Barnes, G. L., Graves, D. T., and Einhorn, T. A. Fracture healing as a post-natal developmental process: molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation. *J Cell Biochem* 2003;88:873-84.
10. Gordon, J. A., Tye, C. E., Sampaio, A. V., Underhill, T. M., Hunter, G. K., and Goldberg, H. A. Bone sialoprotein expression enhances osteoblast differentiation and matrix mineralization in vitro. *Bone* 2007;41:462-73.
11. Hunter, G. K., Hauschka, P. V., Poole, A. R., Rosenberg, L. C., and Goldberg, H. A. Nucleation and inhibition of hydroxyapatite formation by mineralized tissue proteins. *Biochem J* 1996;317 ( Pt 1):59-64.
12. Hunter, G. K., Kyle, C. L., and Goldberg, H. A. Modulation of crystal formation by bone phosphoproteins: structural specificity of the osteopontin-mediated inhibition of hydroxyapatite formation. *Biochem J* 1994;300 ( Pt 3):723-8.
13. Ishijima, M., Ezura, Y., Tsuji, K., Rittling, S. R., Kurosawa, H., Denhardt, D. T., Emi, M., Nifuji, A., and Noda, M. Osteopontin is associated with nuclear factor kappaB gene expression during tail-suspension-induced bone loss. *Exp Cell Res* 2006;312:3075-83.
14. Kojima, H., Uede, T., and Uemura, T. In vitro and in vivo effects of the overexpression of osteopontin on osteoblast differentiation using a recombinant adenoviral vector. *J Biochem* 2004;136:377-86.
15. Malaval, L., Monfoulet, L., Fabre, T., Pothuaud, L., Bareille, R., Miraux, S., Thiaudiere, E., Raffard, G., Franconi, J. M., Lafage-Proust, M. H., Aubin, J. E., Vico, L., and Amedee, J. Absence of bone sialoprotein (BSP) impairs cortical defect repair in mouse long bone. *Bone* 2009.
16. Malaval, L., Wade-Gueye, N. M., Boudiffa, M., Fei, J., Zirngibl, R., Chen, F., Laroche, N., Roux, J. P., Burt-Pichat, B., Duboeuf, F., Boivin, G., Jurdic, P., Lafage-Proust, M. H., Amedee, J., Vico, L., Rossant, J., and Aubin, J. E. Bone sialoprotein plays a functional role in bone formation and osteoclastogenesis. *J Exp Med* 2008;205:1145-53.
17. Midura, R. J., Vasanji, A., Su, X., Wang, A., Midura, S. B., and Gorski, J. P. Calcospherulites isolated from the mineralization front of bone induce the mineralization of type I collagen. *Bone* 2007;41:1005-16.
18. Monfoulet, L., Malaval, L., Aubin, J. E., Rittling, S., Gadeau, A. P., Fricain, J. C., and Chassande, O. BSP but not OPN deficiency, impairs the mineralization of regenerating bone during cortical defect healing. *Bone* 2009;Submitted (In revision).
19. Monfoulet, L., Rabier, B., Chassande, O., and Fricain, J. C. Drilled hole defects in mouse femur as models of intramembranous cortical and cancellous bone regeneration. *Calcif Tissue Int* 2009.
20. Pampena, D. A., Robertson, K. A., Litvinova, O., Lajoie, G., Goldberg, H. A., and Hunter, G. K. Inhibition of hydroxyapatite formation by osteopontin phosphopeptides. *Biochem J* 2004;378:1083-7.
21. Raheja, L. F., Genetos, D. C., and Yellowley, C. E. Hypoxic osteocytes recruit human MSCs through an OPN/CD44-mediated pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;366:1061-6.
22. Rittling, S. R., Matsumoto, H. N., McKee, M. D., Nanci, A., An, X. R., Novick, K. E., Kowalski, A. J., Noda, M., and Denhardt, D. T. Mice lacking osteopontin show normal development and bone structure but display altered osteoclast formation in vitro. *J Bone Miner Res* 1998;13:1101-11.
23. Shimizu, T., Mehdi, R., Yoshimura, Y., Yoshikawa, H., Nomura, S., Miyazono, K., and Takaoka, K. Sequential expression of bone morphogenetic protein, tumor necrosis factor,

- and their receptors in bone-forming reaction after mouse femoral marrow ablation. *Bone* 1998;23:127-33.
24. Sodek, J., Ganss, B., and McKee, M. D. Osteopontin. *Crit Rev Oral Biol Med* 2000;11:279-303.
  25. Tsuji, K., Komori, T., and Noda, M. Aged mice require full transcription factor, Runx2/Cbfa1, gene dosage for cancellous bone regeneration after bone marrow ablation. *J Bone Miner Res* 2004;19:1481-9.
  26. Uthoff, H. K., and Rahn, B. A. Healing patterns of metaphyseal fractures. *Clin Orthop Relat Res* 1981:295-303.
  27. Uusitalo, H., Rantakokko, J., Ahonen, M., Jamsa, T., Tuukkanen, J., KaHari, V., Vuorio, E., and Aro, H. T. A metaphyseal defect model of the femur for studies of murine bone healing. *Bone* 2001;28:423-9.
  28. Valverde, P., Zhang, J., Fix, A., Zhu, J., Ma, W., Tu, Q., and Chen, J. Overexpression of Bone Sialoprotein Leads to an Uncoupling of Bone Formation and Bone Resorption in Mice. *J Bone Miner Res* 2008.
  29. Xian, C. J., Zhou, F. H., McCarty, R. C., and Foster, B. K. Intramembranous ossification mechanism for bone bridge formation at the growth plate cartilage injury site. *J Orthop Res* 2004;22:417-26.
  30. Yamashita, T., Yoshitake, H., Tsuji, K., Kawaguchi, N., Nabeshima, Y., and Noda, M. Retardation in bone resorption after bone marrow ablation in klotho mutant mice. *Endocrinology* 2000;141:438-45.
  31. Yoshitake, H., Rittling, S. R., Denhardt, D. T., and Noda, M. Osteopontin-deficient mice are resistant to ovariectomy-induced bone resorption. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:8156-60.
  32. Zhou, F. H., Foster, B. K., Sander, G., and Xian, C. J. Expression of proinflammatory cytokines and growth factors at the injured growth plate cartilage in young rats. *Bone* 2004;35:1307-15.

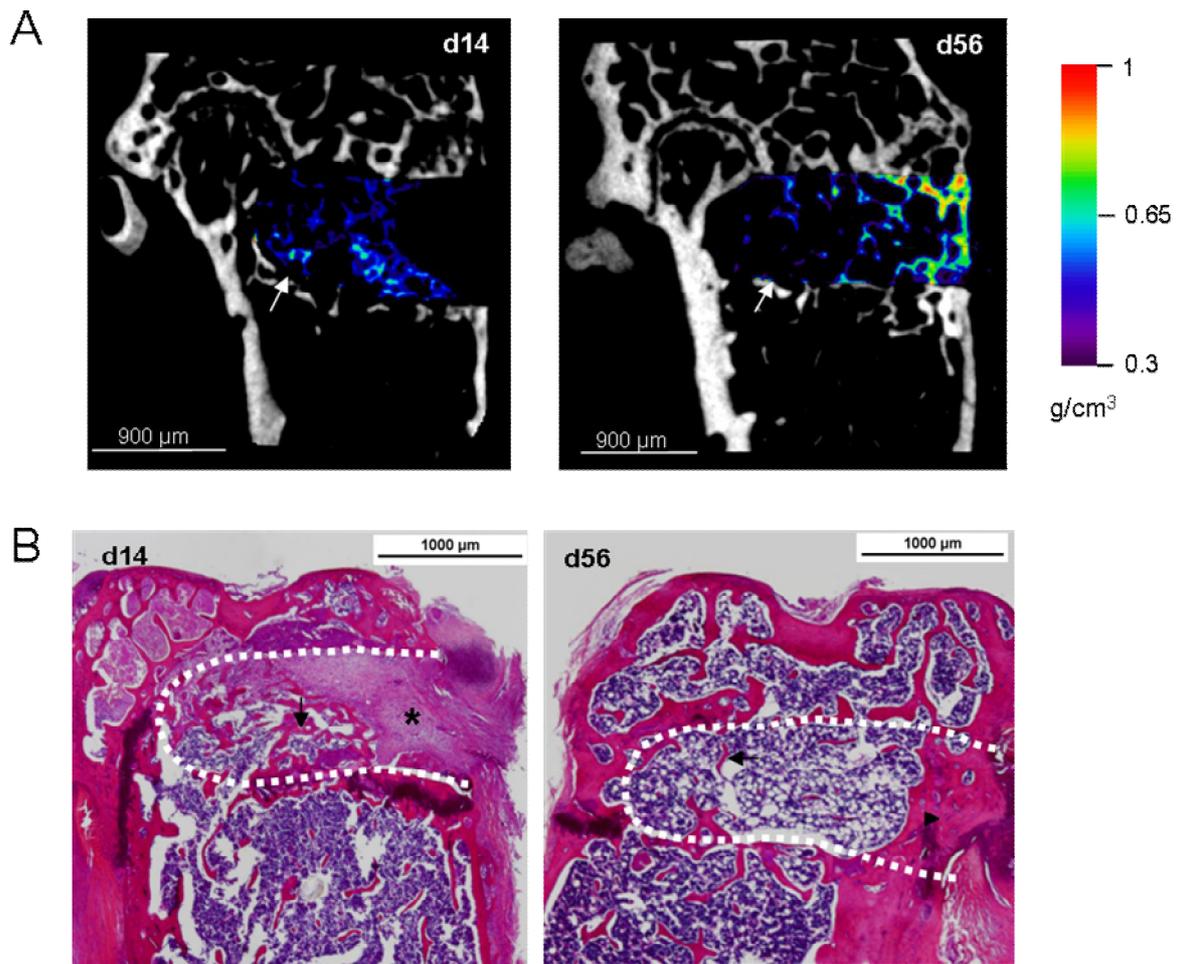
**Figure 1:** Schematic representation of the position of the drilled hole in the mouse femur.



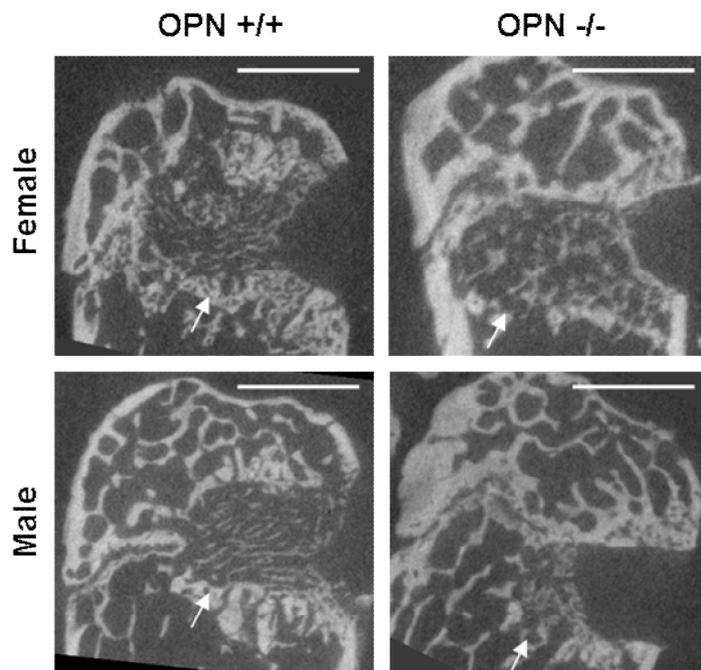
**Figure 2:** Delineation of the region of interest (ROI) for the quantitative analysis of trabecular bone formed within the defect from  $\mu$ CT images.



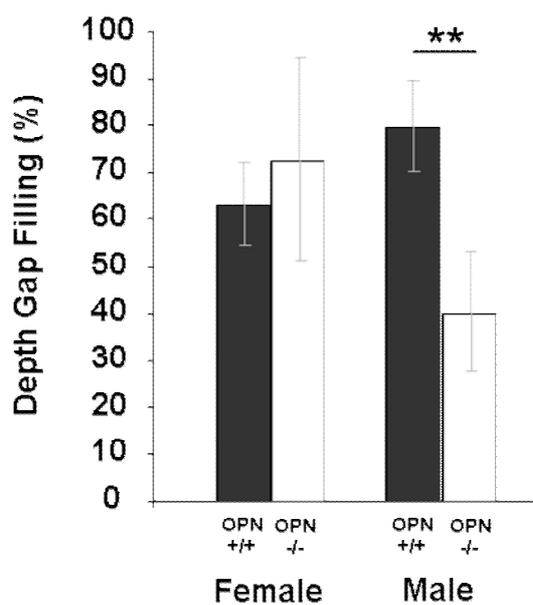
**Figure 3:** Epi-metaphyseal defect healing 14 and 56 days after surgery. A:  $\mu$ CT mapping of the density of new bone formed within the defect. White arrow shows trabecular bone delineating the defect cavity. Colour scale indicates the correspondence between colours and tissue mineral density ( $\text{g}/\text{cm}^3$ ). B: Histological sections staining by HES. White dotted line delimits the defect border. Black arrows indicate trabecular bone, black star show the fibrous tissue and black arrowhead position cortical new bone formed within the defect.



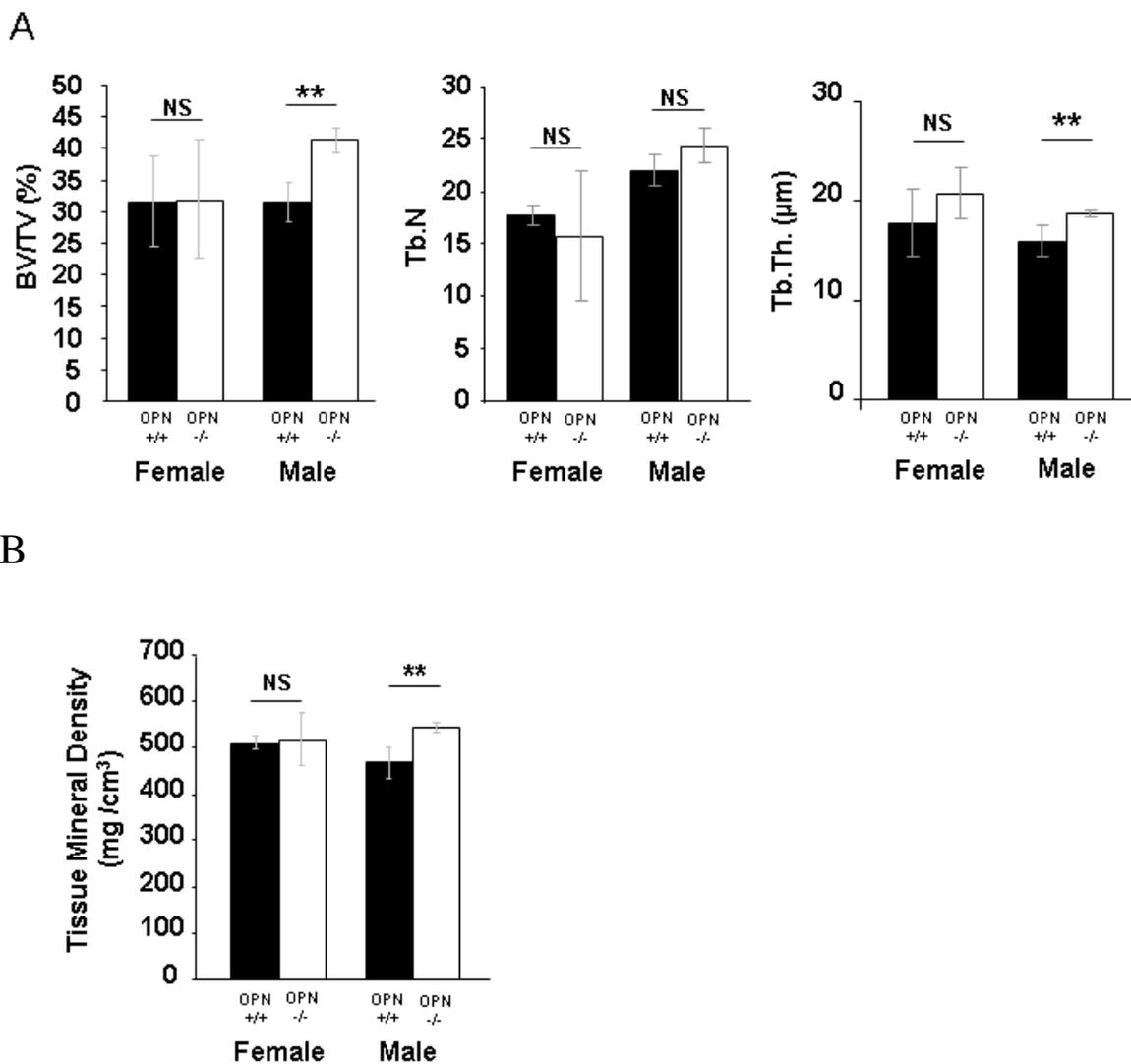
**Figure 4:**  $\mu$ CT images of epi-metaphyseal defect in wild-type and OPN-deficient mice 14 days after surgery. Arrows shows the envelope of porous mineralized tissue that delineated defect cavity. Bar scales represent 1  $\mu$ m.



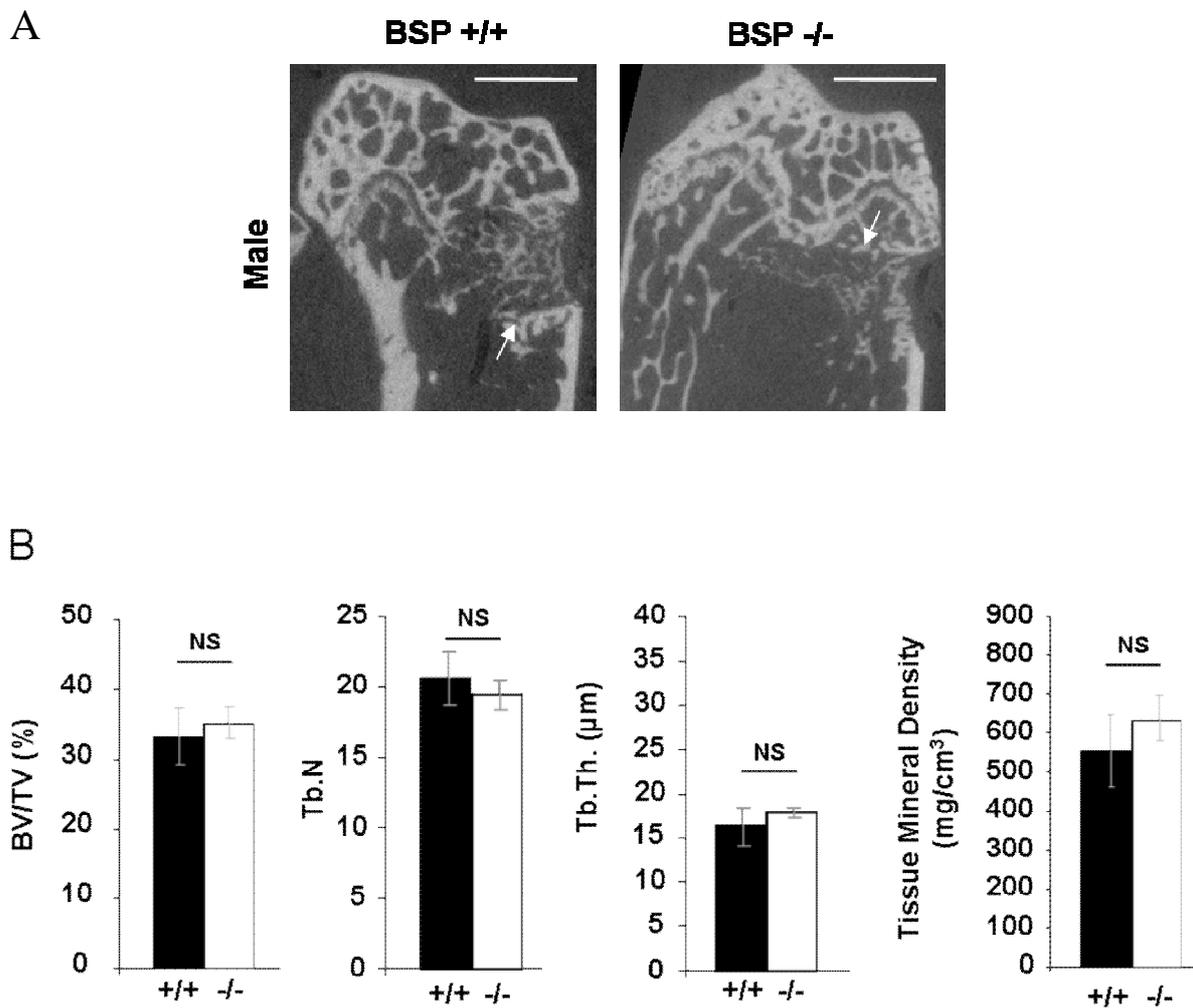
**Figure 5:** Quantification of the depth gap filling in wild-type and OPN-deficient mice 14 days after surgery. Bars represent standard deviation. Statistical analyses were performed using Mann-Whitney U-Test, \*\*:  $p < 0.01$ .



**Figure 6:**  $\mu$ CT analysis of newly bone formed bone within the epi-metaphyseal cavity in wild-type and OPN-deficient mice 14 days after surgery. A: Bone Volume Fraction (BV/TV, expressed in percentage), Trabecular Number (Tb.N); and Trabecular thickness (Tb.Th., expressed in  $\mu\text{m}$ ) were measured from  $\mu$ CT images. B: Tissue Mineral Density (TMD, expressed in  $\text{mg}/\text{cm}^3$ ). Bars represent standard deviation. Statistical analyses were performed using Mann-Whitney U-Test; NS:  $p > 0.05$  (no significant); \*\*:  $p < 0.01$ .



**Figure 7:**  $\mu$ CT analysis of epimetaphyseal defect in wild-type and BSP-deficient mice 14 days after surgery. A:  $\mu$ CT images of epimetaphyseal defect healing. Arrows shows the envelope of porous mineralized tissue that delineated defect cavity. Bar scales represent 1 $\mu$ m. B: Quantification of spongy bone repair. Bone Volume Fraction (BV/TV, expressed in percentage), Trabecular Number (Tb.N), Trabecular thickness (Tb.Th., expressed in  $\mu$ m) Tissue Mineral Density (TMD, expressed in mg/cm<sup>3</sup>) were measured from  $\mu$ CT images. Bars represent standard deviation. Statistical analyses were performed using Mann-Whitney U-Test; NS: p>0.05 (no significant).



## 2.4 Conclusion

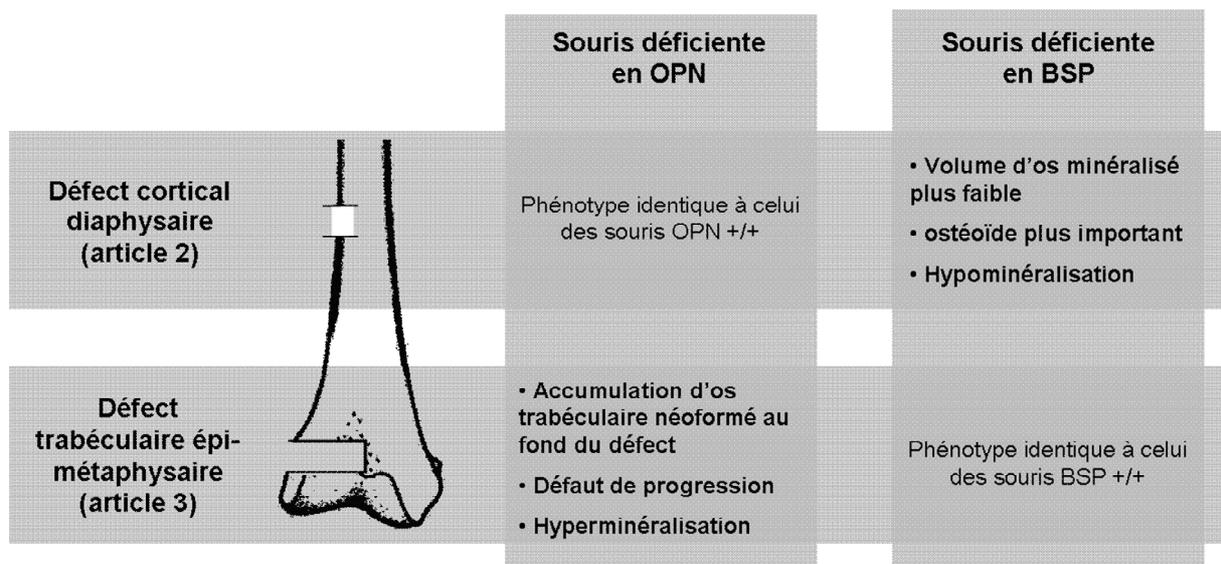
Les travaux présentés dans les deux articles (article 2 et article 3) ont consisté en l'étude du rôle respectif de l'OPN et de la BSP, deux protéines de la matrice extracellulaire osseuse, sur deux modèles distincts de réparation osseuse grâce à l'utilisation de modèle murin déficient pour ces protéines. Les principaux résultats sont résumés dans la Figure 49.

Ainsi, nous avons pu montrer que l'OPN était impliquée dans la réparation de l'os trabéculaire épi-métaphysaire et non dans la réparation de l'os cortical diaphysaire. En effet, son absence induit, 14 jours après la lésion, une accumulation d'os d'aspect trabéculaire au fond de la cavité épi-métaphysaire. Cet os se caractérise par un volume osseux et une épaisseur des travées osseuses significativement plus élevés chez les souris OPN<sup>-/-</sup> que chez les souris OPN<sup>+/+</sup>. Par ailleurs, le nombre de travée osseuse n'est pas modifié en absence d'OPN, suggérant que l'OPN n'agit pas sur la formation osseuse. L'accumulation de cet os néoformé est accentuée par une étendue de la zone de formation osseuse statistiquement plus faible chez les souris OPN<sup>-/-</sup>. Sachant que dans le profil de réparation du défaut épi-métaphysaire, l'os se forme à partir des éléments osseux présents au fond du défaut, puis qu'il se condense pour former un mur qui va progressivement se déplacer vers l'espace cortical à combler, les données sur la réparation de ce défaut chez les souris OPN<sup>-/-</sup> suggèrent un rôle de l'OPN dans la progression de l'os dans le défaut. A noter, l'os trabéculaire néoformé chez les animaux déficients en OPN, présente une densité osseuse supérieure à celle des animaux OPN<sup>+/+</sup>, conformément au rôle inhibiteur de l'OPN sur la minéralisation. La réparation de l'os cortical diaphysaire, quand à elle, n'est pas affectée par l'absence d'OPN.

En ce qui concerne, l'effet de la déficience en BSP sur ces deux modèles de réparation, nous avons mis en évidence un phénotype à la fois opposé et différent de celui observé chez les animaux déficients en OPN. Ainsi, l'absence de BSP n'induit aucune modification de la réparation de l'os trabéculaire épi-métaphysaire, alors qu'elle retarde celle de l'os cortical diaphysaire. En effet, nous avons montré que la déficience en BSP n'induisait aucune modification des paramètres osseux mesurés dans la zone de réparation épi-métaphysaire.

Au niveau diaphysaire, la réparation de l'os cortical présente un volume d'os néoformé minéralisé à 14 jours significativement plus faible chez les animaux BSP<sup>-/-</sup> que chez les BSP<sup>+/+</sup>. Celle-ci s'accompagne d'un tissu ostéoïde plus important, suggérant que l'absence de BSP n'empêche pas le dépôt de la matrice ostéoïde mais uniquement sa minéralisation entraînant de ce fait un retard de réparation. Par ailleurs, l'os formé chez les animaux BSP<sup>-/-</sup> présente une densité osseuse plus faible que celle des animaux <sup>+/+</sup>.

Ces travaux mettent en évidence que l'OPN et la BSP n'ont pas de fonctions redondantes dans la réparation osseuse. En effet, l'OPN intervient principalement dans la réparation de l'os trabéculaire alors que la BSP semble intervenir dans le processus de réparation de l'os cortical diaphysaire. Toutefois, l'absence de ces protéines n'altère pas la formation osseuse. Le défaut de réparation chez les souris BSP<sup>-/-</sup> serait dû à un défaut de minéralisation de l'ostéoïde, alors que le retard observé chez les souris OPN<sup>-/-</sup> serait lié à un défaut de progression de l'os au sein de la cavité. Enfin, le rôle antagoniste des deux protéines sur la minéralisation a été également décrit dans ces modèles de réparation.



**Figure 49 : Récapitulatif des phénotypes observés chez les souris déficientes en OPN et en BSP au cours de la réparation de l'os cortical diaphysaire et de l'os trabéculaire épi-métaphysaire.**

## **Conclusions et perspectives**

---

Les mécanismes de la réparation osseuse, et particulièrement le rôle des protéines matricielles, ont été étudiés dans le cadre de lésions de l'os cortical et de l'os trabéculaire. La réparation de ces lésions a tout d'abord fait l'objet d'une caractérisation. Par la suite, l'implication de l'OPN et celle de la BSP ont été étudiées grâce à des modèles murins déficients pour l'une ou l'autre de ces protéines.

Dans la première partie de ce travail, les modèles de lésions ont été caractérisés en termes de cinétique et de profil de réparation. Il apparaît que le défaut cortical diaphysaire et le défaut épi-métaphysaire, réalisés dans le fémur chez la souris, se régénèrent tous deux de façon naturelle en mettant en place un mécanisme d'ossification intramembranaire. Ce mécanisme de réparation ne rappelle pas l'ontogenèse des os longs qui se fait par ossification endochondrale. Cependant, la mise en place de l'ossification intramembranaire se justifie en partie par l'absence de contraintes mécaniques au sein du tissu lésé [Claes et al. 1999].

Cette étude montre que la réparation de l'os cortical diaphysaire diffère significativement de celle d'une lésion épi-métaphysaire qui engendre une destruction de l'os trabéculaire, de l'os cortical et d'une partie de la plaque de croissance. La réparation de l'os cortical diaphysaire se fait localement au niveau de la lésion corticale et de façon centripète conduisant rapidement à la formation d'un os cortical mature. Au contraire, la réparation de l'os trabéculaire et de l'os cortical dans le modèle épi-métaphysaire est plus lente. Elle est initiée à partir d'éléments présents au fond de la cavité. L'os nouvellement formé se condense et progresse graduellement vers la partie corticale à combler, laissant derrière lui des éléments osseux trabéculaires.

La disparité de profil de réparation entre les deux modèles peut en partie s'expliquer par l'origine différentielle des cellules ostéoprogénitrices (Figure 50). La rapidité de la réparation diaphysaire suggère que la formation osseuse est initiée par des cellules locales telles que celles du périoste. Cette source de cellules a déjà été démontré par des expériences d'ablation du périoste [Oni et al. 1992; Ozaki et al. 2000], par des expériences de greffes osseuses [Colnot 2009] et dans le cadre de l'ingénierie du tissu osseux [Hutmacher et al. 2003; Zhang et al. 2008]. Cependant, dans notre modèle, l'ablation mécanique du périoste n'altère pas la réparation osseuse suggérant une autre source d'ostéoprogéniteurs locaux. L'endoste et la moelle osseuse présentent eux aussi un potentiel ostéogénique [Uchida et al. 2000; Kaigler et al. 2005; Kretlow et al. 2008]. Les travaux de greffes de tissu osseux diaphysaire réalisés par Colnot et al montrent que l'os formé entre le tissu hôte et le greffon se compose de cellules osseuses provenant de l'endoste, du périoste et de la moelle osseuse présentes dans le greffon [Colnot 2009]. De plus, l'ablation de l'un de ces trois compartiments ne semble pas compromettre la formation osseuse permettant l'intégration du greffon dans le tissu hôte. Ces données indiquent que l'endoste peut être une source de cellules ostéoprogénitrices équivalente au périoste pour la réparation diaphysaire.

Au niveau de l'épi-métaphyse, la réparation osseuse est initiée par le fond du défaut. Lorsque la perforation traverse de part en part l'os, la réparation est compromise. Quand elle est initiée, elle prend place à proximité de travées osseuses et de la moelle osseuse suggérant un rôle des cellules mésenchymateuses médullaires et des cellules bordantes osseuses. Ces dernières sont mobilisées au cours de la réparation d'une lésion de la plaque de croissance [Xian et al. 2004].

Quelle que soit sa position sur l'os long, un défaut se répare spontanément par un processus d'ossification intramembranaire initié par des ostéoprogéniteurs d'origine variée. Le modèle diaphysaire est un modèle purement cortical, alors que le modèle réalisé dans l'épi-métaphyse présente dans sa première partie, une réparation de l'os trabéculaire puis une réparation de l'os cortical épi-métaphysaire.

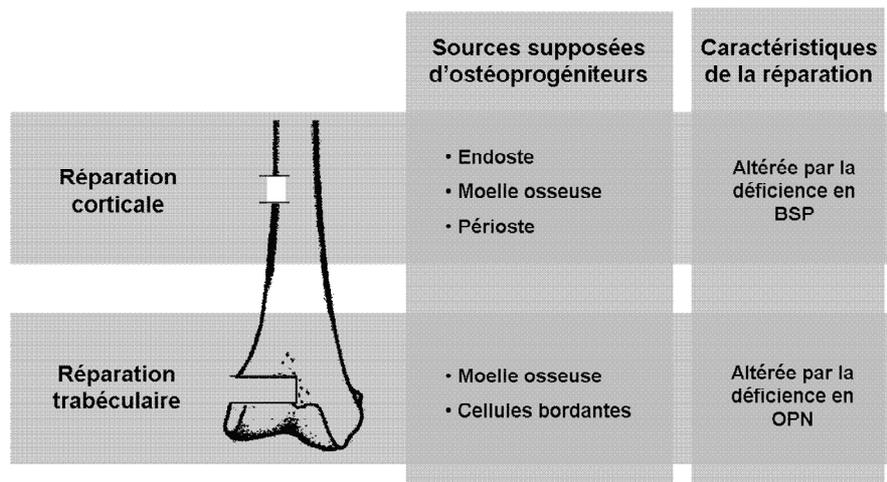


Figure 50 : Hypothèse quant à l'origine des ostéoprogéniteurs impliqués dans la réparation.

Ces travaux ont servi de base à l'étude du rôle respectif de l'ostéopontine et de la BSP dans la réparation osseuse.

Les analyses quantitatives réalisées dans la zone corticale diaphysaire en réparation ne révèlent pas de différence entre les animaux OPN<sup>+/+</sup> et les animaux OPN<sup>-/-</sup> pour la densité osseuse, le volume d'os minéralisé, le tissu ostéoïde et les surfaces ostéoclastiques. Ces résultats suggèrent que le dépôt de matrice, la minéralisation, et le remodelage de l'os primaire en os cortical mature ne sont pas affectés par la déficience en OPN. A l'opposé, l'absence d'OPN affecte sévèrement la réparation de l'os trabéculaire. Chez les souris OPN<sup>-/-</sup>, l'os néoformé s'accumule au fond de la cavité et ne s'y propage pas comme dans les souris OPN<sup>+/+</sup>. Le fait que l'os primaire ne réussit pas à s'étendre dans la cavité épi-métaphysaire, suggère que l'OPN est impliquée dans la progression du front de formation osseuse. Ce rôle pourrait être dû à un effet stimulateur de l'OPN sur résorption du tissu fibreux, ou à son action en tant qu'élément important pour le recrutement des ostéoblastes au front de formation osseuse. L'OPN a déjà été décrite comme étant impliquée dans le recrutement et la migration cellulaire dans différents modèles [Asou et al. 2001; Raheja et al. 2008], et dans le remodelage osseux [Rittling et al. 1998; Duvall et al. 2007]. Par ailleurs, l'OPN peut interagir avec différentes métalloprotéases, notamment les MMP 3, 9 et 13 [Fedarko et al. 2004; Castellano et al. 2008; Chen et al. 2009; Matsui et al. 2009]. De tels mécanismes pourraient être impliqués dans la progression du front de réparation à travers le défaut durant la réparation de l'os trabéculaire. L'analyse de l'expression de MMP au cours de la réparation chez les animaux OPN<sup>-/-</sup> et OPN<sup>+/+</sup> pourrait être envisageable.

L'ensemble des données recueillies montre que le dépôt de matrice par les ostéoblastes n'est pas altéré dans ce modèle murin suggérant que l'OPN ne joue pas un rôle majeur dans l'activité de formation osseuse des ostéoblastes. Il reste toutefois possible que chez les animaux déficients en OPN, d'autres protéines puissent se substituer à l'OPN. De fait, nous avons montré que la BSP est surexprimée chez les animaux OPN<sup>-/-</sup>. *In vitro*, la surexpression de BSP dans une lignée ostéoblastique augmente la formation de nodules de minéralisation et de l'expression de marqueurs ostéoblastiques [Gordon et al. 2007]. L'ensemble de ces données suggèrent que la BSP est un candidat pertinent pour compenser la déficience en OPN.

En ce qui concerne la BSP, les phénotypes observés chez les animaux BSP<sup>-/-</sup> au cours de la réparation de l'os cortical et l'os trabéculaire sont diamétralement opposés à ceux des animaux OPN<sup>-/-</sup>. Ainsi, la déficience en BSP induit une altération de la minéralisation de

l'ostéoïde formé au niveau de la zone corticale diaphysaire, alors qu'aucun dommage n'est détecté au cours de la réparation de la zone épi-métaphysaire.

Les défauts observés au cours de la réparation osseuse dans les deux modèles de lésions peuvent être liés à un défaut de remodelage de l'os primaire formé rapidement en os secondaire mature. Ce remodelage nécessite l'intervention des ostéoclastes. Ostéoclastes pour lesquels il a été décrit que l'OPN et la BSP sont des activateurs de l'ostéoclastogenèse et de leurs activités [Chellaiah et al. 2003; Contractor et al. 2005; Malaval et al. 2008]. L'étude des ostéoclastes au cours de la réparation, par marquage enzymatique de l'enzyme TRAP et l'analyse par histomorphométrie, permettrait de répondre à la question de l'implication d'un défaut ostéoclastique dans le retard de réparation.

De nombreuses études portant sur le rôle des SIBLINGs sur la physiologie du tissu osseux ont été réalisées sur des souris femelles [Yoshitake et al. 1999; Ihara et al. 2001; Kojima et al. 2004; Ishijima et al. 2006; Malaval et al. 2009]. L'expression de l'OPN est régulée entre autre par l'action du récepteur orphelin  $ERR\alpha$  [Vanacker et al. 1998]. Les travaux de Luedtke et al proposent également un effet des androgènes dans la régulation de l'OPN d'après l'étude de son expression dans les organes reproducteurs mâles [Luedtke et al. 2002]. La surexpression du récepteur aux androgènes dans une lignée ostéoblastique stimule la transcription du gène codant la BSP *in vitro* [Takai et al. 2007]. Ces données suggèrent que le genre pourrait moduler la réponse phénotypique des animaux OPN et BSP déficients au cours de la réparation osseuse. Dans ce travail de thèse, l'effet du genre sur la réparation osseuse chez les animaux OPN et BSP a été étudié. Au cours de la réparation épi-métaphysaire chez les animaux OPN déficients, il apparaît que le phénotype observé est plus marqué chez les mâles que chez les femelles. A l'heure actuelle, aucune donnée ne permet d'expliquer la différence phénotypique observée entre les mâles et les femelles au cours de la réparation.

L'une des interrogations soulevées au cours de cette thèse portait sur la redondance et la compensation fonctionnelle des protéines SIBLINGs dans la réparation osseuse. En effet, quelques observations préalables suggèrent une redondance fonctionnelle entre OPN et BSP au niveau du tissu osseux. Différentes études *in vivo* ont décrit une augmentation du volume osseux trabéculaire chez les souris OPN  $-/-$  et BSP  $-/-$  [Chellaiah et al. 2003; Harmey et al. 2006]. D'autres études quant à elles ont montré une expression génique compensatoire dans les lignées génétiquement déficientes. C'est notamment le cas pour la lignée de souris déficiente en OPN pour laquelle les travaux d'Ishijima et al montrent une surexpression de la BSP dans les os longs [Ishijima et al. 2006]. Au cours de la réparation osseuse, nous avons montré que l'absence d'OPN induisait un défaut de réparation épi-métaphysaire, distinct de celui induit par la déficience en BSP au niveau diaphysaire. Cet effet ne semble par être compensé par la surexpression de la BSP décrite dans les os longs des animaux OPN $-/-$ . Inversement, la déficience en BSP induit un défaut de réparation de l'os cortical non compensé par la diminution de l'expression de l'OPN décrite dans les os longs [Malaval et al. 2009]. L'analyse moléculaire de l'expression des SIBLINGs au cours de la réparation épi-métaphysaire, dans chacune des lignées murines, restent à mesurer afin de vérifier les effets compensatoires entre l'OPN et la BSP.

Il apparaît ainsi que pour certaines des fonctions telles que le contrôle de la minéralisation dans l'os diaphysaire ou le contrôle de la migration du front de réparation épi-métaphysaire, l'OPN et la BSP ne sont pas redondantes. Par ailleurs, cette analyse ne renseigne en rien sur un éventuel effet de compensation pour d'autres fonctions notamment sur l'activité des ostéoblastes, l'activité des ostéoclastes ou encore l'angiogenèse. Il semble pertinent

d'envisager de réaliser un double mutant *OPN*<sup>-/-</sup> *BSP*<sup>-/-</sup> afin de s'assurer de l'absence de redondance fonctionnelle et l'absence d'effet compensatoire entre ces deux SIBLINGs. Du fait, de la présence des gènes *OPN* et *BSP* sur le même locus génique, la génération du double mutant ne repose pas sur le simple croisement des lignées de simple mutant déjà existantes. Elle nécessite la réalisation d'une nouvelle transgénèse au sein de cellules embryonnaires aboutissant à l'inactivation des deux gènes.

Par ailleurs, l'ensemble de ces résultats ont été obtenu par utilisation de modèles de génétiques expérimentales établis dans des fonds génétiques différents (*OPN* : C57bl6/J et *BSP* : CD-1/129), nécessitant, dans un souci de rigueur, de ramener les deux modèles dans le même fond génétique.

Pour finir, les données recueillies dans cette étude soulèvent une interrogation quant à la similarité des ostéoprogéniteurs impliqués dans la réparation (Figure 50). Comme mentionné dans cette thèse, les cellules impliquées dans la réparation des deux modèles de lésions peuvent avoir des origines différentes (moelle osseuse, endoste, périoste ou cellules bordantes). Cette diversité de sources pourrait expliquer la différence dans le profil de réparation observée entre les deux modèles de défaut.

Des réponses pourraient être apportées par l'utilisation de cellules génétiquement marquées par des protéines « traceurs », par des greffes de moelle osseuse ou d'infection virale locale (périoste, endoste) permettant de suivre le recrutement des ostéoprogéniteurs au cours de la réparation.

Par ailleurs, il apparaît que ces ostéoprogéniteurs auraient au final une sensibilité différente à la déficience en *OPN* ou en *BSP*. Cette sensibilité pourrait également être liée à la nature de l'os que doivent régénérer ces progéniteurs: os cortical, lamellaire dans le cas de la réparation diaphysaire ; os principalement trabéculaire, spongieux dans le modèle épi-métaphysaire. Cette hypothèse rejoint la question soulevée par Gorski sur l'implication de la distribution et la composition des protéines non collagéniques de l'os lamellaire et de l'os tissé sur l'existence de mécanismes ostéogéniques différents [Gorski 1998].

Au cours de ces travaux, l'utilisation des différents modèles, que ce soit les modèles de lésions ou ceux de génétique expérimentale, a permis d'améliorer la compréhension de l'implication des protéines de la matrice extracellulaire dans les mécanismes de la réparation osseuse tout en soulevant de nouvelles perspectives de travail.

## **Annexes**

---



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Bone

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/bone](http://www.elsevier.com/locate/bone)1 Absence of bone sialoprotein (BSP) impairs cortical defect repair in mouse long bone<sup>☆</sup>

2 Luc Malaval<sup>a,b,c,\*</sup>, Laurent Monfoulet<sup>d,e</sup>, Thierry Fabre<sup>f</sup>, Laurent Pothuau<sup>g</sup>, Reine Bareille<sup>d,e</sup>,  
 3 Sylvain Miraux<sup>h</sup>, Eric Thiaudiere<sup>h</sup>, Gerard Raffard<sup>h</sup>, Jean-Michel Franconi<sup>h</sup>, Marie-Hélène Lafage-Proust<sup>a,b,c</sup>,  
 4 Jane E. Aubin<sup>i</sup>, Laurence Vico<sup>a,b,c</sup>, Joëlle Amédée<sup>d,e</sup>

5 <sup>a</sup> Université de Lyon, Saint-Etienne, F42023, France6 <sup>b</sup> INSERM U890, Saint-Etienne, F42023, France7 <sup>c</sup> IFR 143, Saint-Etienne, F42023, France8 <sup>d</sup> INSERM U577, Bordeaux, F33076, France9 <sup>e</sup> Université Victor Segalen, Bordeaux, F33076, France10 <sup>f</sup> CHU Pellegrin, Service de Traumatologie et d'Orthopédie, Bordeaux, France11 <sup>g</sup> MED-IMAPS Plateforme Technologique d'Innovation Biomédicale, Hôpital Xavier Arnoz, 33600 Pessac, France12 <sup>h</sup> RMSB, UMR 5536 CNRS/Université Victor Segalen, Bordeaux, F33076, France13 <sup>i</sup> Department of Molecular Genetics, University of Toronto, Toronto, Ontario, Canada M5S 1A8

14

## ARTICLE INFO

15 *Article history:*  
 16 Received 5 September 2008  
 17 Revised 13 May 2009  
 18 Accepted 2 June 2009  
 19 Available online xxxxx

20 Edited by: R. Baron

21 *Keywords:*

22 Bone sialoprotein  
 23 SIBLINGs  
 24 Cortical defect  
 25 Osteoblast  
 26 Osteoclast

## ABSTRACT

Matrix proteins of the SIBLING family interact with bone cells and with bone mineral and are thus in a key position to regulate bone development, remodeling and repair. Within this family, bone sialoprotein (BSP) is highly expressed by osteoblasts, hypertrophic chondrocytes and osteoclasts. We recently reported that mice lacking BSP (BSP<sup>-/-</sup>) have very low trabecular bone turnover. In the present study, we set up an experimental model of bone repair by drilling a 1 mm diameter hole in the cortical bone of femur in both BSP<sup>-/-</sup> and +/+ mice. A non-invasive MRI imaging and bone quantification procedure was designed to follow bone regeneration, and these data were extended by  $\mu$ CT imaging and histomorphometry on undecalcified sections for analysis at cellular level. These combined approaches revealed that the repair process as reflected in defect-refilling in the cortical area was significantly delayed in BSP<sup>-/-</sup> mice compared to +/+ mice. Concomitantly, histomorphometry showed that formation, mineralization and remodeling of repair (primary) bone in the medulla were delayed in BSP<sup>-/-</sup> mice, with lower osteoid and osteoclast surfaces at day 15. In conclusion, the absence of BSP delays bone repair at least in part by impairing both new bone formation and osteoclast activity.

© 2009 Published by Elsevier Inc.

## Introduction

Extracellular matrix (ECM) proteins of the SIBLING (Small Integrin-Binding Ligand, N-linked Glycoprotein) family (reviewed in [9]), which includes osteopontin (OPN), bone sialoprotein (BSP), dentin matrix protein 1 (DMP1), dentin sialophosphoprotein (DSPP) and matrix extracellular phosphoglycoprotein (MEPE), are believed to play key biological roles in the development, turnover and mineralization of bone and dentin. Within this family, BSP (reviewed in [10]) was initially isolated and subsequently characterized from bovine cortical bone, but has been shown to be expressed in an increasing number of other tissues [24,25] as well as malignant cells [2]. BSP and OPN (reviewed in [28]) contribute to the activity of osteoclasts through an Arg-Gly-Asp (RGD) motif that mediates cell attachment/signaling via its reaction with cell-surface integrins. Both proteins are secreted by osteoblasts at the pre-osteoblast (in vitro, and for BSP in some in vivo studies [5,19]) and osteoblast stages [5,27], and both have also been shown to modulate the structure of mineralized matrix in vitro [15].

*Abbreviations:* MRI, magnetic resonance imaging;  $\mu$ CT, microcomputed tomography; ROI, region of interest.

<sup>\*</sup> Funding sources: Canadian Institutes of Health Research (FRN 83704 to JEA); "Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale" (INSERM) and "Centre National de la Recherche Scientifique" (CNRS), through both basal funding to affiliated laboratories and a collective grant within the "Ingénierie Tissulaire-Biomécanique-Biomatériaux" (IT2B) INSERM/CNRS cooperative program (to JA, MHL, LM and LV).

<sup>\*</sup> Corresponding author. INSERM U890-LBTO, IFR 143-IFRESIS, Université Jean Monnet, Faculté de Médecine, 15, rue A. Paré, F42023 St. Etienne Cedex 02, France. Fax: +33 4 77 57 55 72.

*E-mail addresses:* [luc.malaval@univ-st-etienne.fr](mailto:luc.malaval@univ-st-etienne.fr) (L. Malaval), [laurent-emmanuel.monfoulet@u-bordeaux2.fr](mailto:laurent-emmanuel.monfoulet@u-bordeaux2.fr) (L. Monfoulet), [thierry.fabre@chu-bordeaux.fr](mailto:thierry.fabre@chu-bordeaux.fr) (T. Fabre), [lpothuaud@wanadoo.fr](mailto:lpothuaud@wanadoo.fr) (L. Pothuau), [reine.bareille@bordeaux.inserm.fr](mailto:reine.bareille@bordeaux.inserm.fr) (R. Bareille), [miraux@rmsb.u-bordeaux2.fr](mailto:miraux@rmsb.u-bordeaux2.fr) (S. Miraux), [eric.thiaudiere@rmsb.u-bordeaux2.fr](mailto:eric.thiaudiere@rmsb.u-bordeaux2.fr) (E. Thiaudiere), [gerard.raffard@rmsb.u-bordeaux2.fr](mailto:gerard.raffard@rmsb.u-bordeaux2.fr) (G. Raffard), [jmichel.franconi@rmsb.u-bordeaux2.fr](mailto:jmichel.franconi@rmsb.u-bordeaux2.fr) (J.-M. Franconi), [MHLafage.Proust@univ-st-etienne.fr](mailto:MHLafage.Proust@univ-st-etienne.fr) (M.-H. Lafage-Proust), [jane.aubin@utoronto.ca](mailto:jane.aubin@utoronto.ca) (J.E. Aubin), [vico@univ-st-etienne.fr](mailto:vico@univ-st-etienne.fr) (L. Vico), [joelle.amedee@bordeaux.inserm.fr](mailto:joelle.amedee@bordeaux.inserm.fr) (J. Amédée).

8756-3282/\$ – see front matter © 2009 Published by Elsevier Inc.  
 doi:10.1016/j.bone.2009.06.005

Please cite this article as: Malaval L, et al., Absence of bone sialoprotein (BSP) impairs cortical defect repair in mouse long bone, Bone (2009), doi:10.1016/j.bone.2009.06.005

Bone fracture healing involves a well-characterized cascade of events that includes hematoma formation, inflammation, soft cartilage tissue formation, neovascularization, osteoblastic callus mineralization and osteoclastic remodeling of the hard callus back to lamellar bone (see [11] for review). This complex sequence is coordinated by a variety of growth factors and extracellular matrix proteins. OPN and BSP have a key position at the interface between cells and matrix, being coexpressed in various cell types/stages and both actively involved in bone deposition/remodeling. It is thus important to clearly establish their roles, functional specificities and degree of redundancy in the fracture repair context. Recently, Duvall et al. [8] used a unilateral femoral fracture model to study bone repair in OPN<sup>-/-</sup> mice, and found deficiencies targeting several tissues at successive stages of the repair process, providing new insight into the control of bone vascularization and regeneration. We have now studied the repair of a cortical defect in wild type and BSP-deficient mice (BSP<sup>-/-</sup>), and report that the latter display delayed cortex reconstitution and repair bone deposition, mineralization and turnover, likely due to impaired osteoblast and osteoclast activity.

## Material and methods

### Production of BSP<sup>-/-</sup> mice

Construction of the *bsp*-null targeting vector and chimeric BSP<sup>-/-</sup> mouse production have been described in detail previously [20]. Briefly, exons II–III of the BSP mouse gene were replaced by a PGKneo cassette that created a null allele in mouse embryonic stem (ES) cells (R1 passage 8; kindly provided by Dr. Andras Nagy [23]) that were selected as described previously [14]. Positive clones were used to make chimeric mice which were crossed to albino CD1 outbred females, and a chimeric male with germline transmission of the mutation was used to establish offspring on a 129/CD1 background. Mice were routinely genotyped by Southern blotting as described [20]. BSP<sup>-/-</sup> mice are viable and fertile; their phenotype has been extensively described elsewhere [20].

### Care of animals and sampling procedures

The procedures for the care and killing of the animals were in accordance with the European Union standards on the care and use of laboratory animals (Ministere de l'Agriculture, France, Authorization 04827) and were approved by local animal care committees. During acclimatization and experimentation, the animals were kept in standard conditions of temperature ( $23 \pm 2$  °C) and light-controlled environment (12 h light/12 h dark cycle), and with free access to water and pelleted food (UAR rodent diet No.R03-25; UAR, Epinay/Orge, France). For MRI, a longitudinal analysis was performed on anesthetized mice as described below. After euthanasia, the long bones were dissected out and processed for histomorphometry and  $\mu$ CT, as described below.

### Cortical defect generation and repair

To assess the time course of bone repair, 4-month-old female mice (10 per group) underwent the surgical procedure under anesthesia with Isoflurane. Briefly, the skin was incised at the medial side of the right hindlimb thigh, muscles were pulled aside and a 1 mm diameter hole was drilled through the cortical bone of the right femur, proximal to the knee (Fig. 1b). Bone repair was followed for up to 30 days after surgery by histology, MRI and quantitative  $\mu$ CT.

### MRI methodology and in vivo bone fracture repair evaluation

#### MRI imaging procedure for mouse long bone

Animals were anesthetized with Isoflurane (1.5% in air) and laid on a bed attached to the probe (Fig. 1a). The right leg was stretched out

and immobilized, and the knee positioned at the center of the NMR coil, from which it was isolated by a polyethylene ring. Animals were imaged 3, 8 and 21 days after surgery. Experiments were carried out on a 4.7 T Bruker Biospec 47/50 (Bruker, Ettlingen, Germany), equipped with a 6 cm BG6 gradient system capable of 950 mT/m maximum strength and 80  $\mu$ s rise time. A liquid-state high-resolution spectroscopy probe was adapted for in vivo MRI <sup>1</sup>H (saddle shape, 11 mm diameter and 16 mm length, 200.3 MHz). Magnetic field was homogenized before each acquisition. Line widths of 40–50 Hz were typically achieved on the leg of the living mouse. Correct positioning of the knee at the magnet isocenter was checked using 3D FLASH low-resolution scout views: TE/TR=3.72/15 ms, excitation pulse=sinc 400  $\mu$ s, nutation angle=20°; FOV=15×10×10 mm; matrix=64×64×64; resolution=234×156×156  $\mu$ m<sup>3</sup>; acquisition bandwidth=8000 Hz (125 Hz/pixel), shifted echo=30%, 1 average, total acquisition time=1 min. High-resolution (62  $\mu$ m isotropic) images were acquired in vivo with a 3D FLASH sequence: TE/TR=2.9/12 ms, excitation pulse=sinc 400  $\mu$ s, nutation angle=15°; FOV=12×8.6×8.6 mm; matrix=192×140×140, acquisition bandwidth=143,16,700 Hz (87 Hz/pixel), shifted echo=20%; in vivo=24 averages (1 h 34 min).

#### Quantitative assessment of cortical bone defect repair

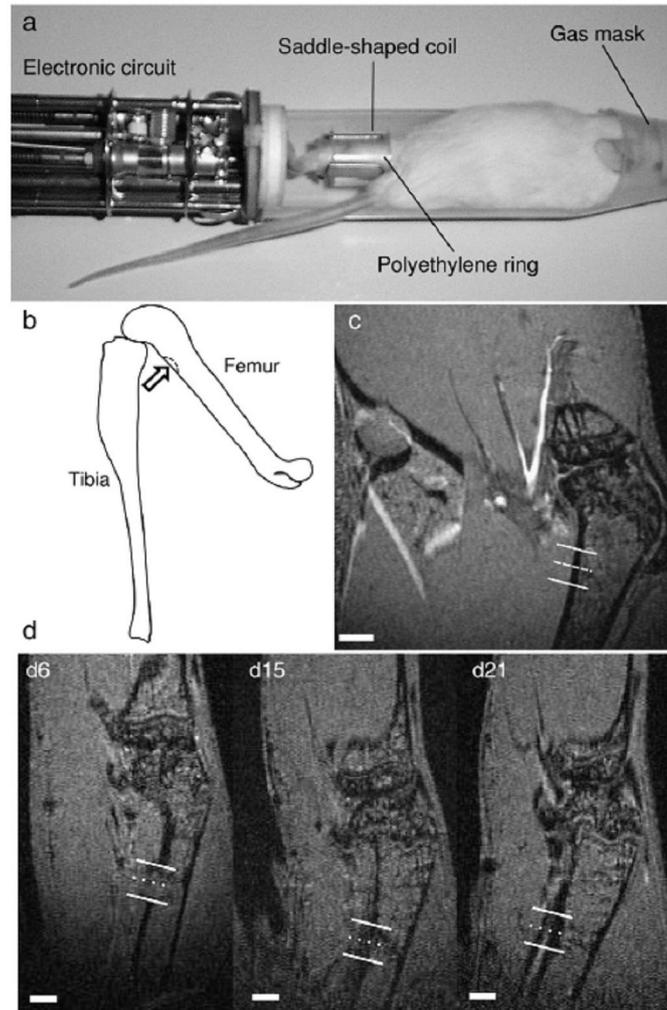
Three, 8 and 21 days after surgery, gray scale images of the defect region were acquired as described above and analyzed for quantification. In a first step, the “fracture” (hole) axis was encompassed by the intersection of two median planes (P1) and (P2) selected from two perpendicular sections. Then, a cylindrical volume of analysis (VOI) was drawn (Figs. 1c, d). Mean value (*M*) and standard deviation (*SD*) of gray levels in the VOI were evaluated as a function of the distance (*d*) to the drilling axis. The coefficient of variation (*CV*) was evaluated as follows:  $CV = M/SD$ . This coefficient characterizes the variation of signal in the VOI, and reflects the variation in bone volume fraction. In order to take into account variations in image signal (=increase in bone density) between successive imaging time-points, the CV factor was normalized on its maximal value ( $CV_{MAX}$ ):  $CV' = CV/CV_{MAX}$ .

### Histology and histomorphometry

At the end of the experimental periods, mice were euthanized and long bones were dissected out and fixed in 3.7% paraformaldehyde in PBS. For histomorphometry, undecalcified bone samples were embedded in methylmethacrylate and longitudinal coronal slices were cut with a Jung model K microtome (Carl Zeiss, Heidelberg, Germany). 8  $\mu$ m thick sections were used for modified Goldner's trichrome staining, using either picric acid (general case) or Weigert hematoxylin (for Figs. 3g, h) as a first bath. alcian blue staining was used for cartilage and TRACP enzymatic staining for osteoclasts, without counter-staining. Static bone parameters (bone volume: BV/TV, trabecular thickness: Tb.Th, trabecular separation: Tb.Sp, trabecular number: Tb.N) were measured at days 5, 10 and 15. At day 15, osteoclast cellular parameters (osteoclast surfaces: Oc.S/BS, osteoclast numbers: Oc.N/BS, osteoclast length : Oc.Le) were measured on TRACP stained sections; surfaces covered by osteoid (OS/BS), that is unmineralized matrix laid down in bone accrual areas on trabecular surfaces (cf. Figs. 6e, f), as well as the bone surface fraction covered by plump (active, cf. Figs. 6e, f) osteoblasts (Ob.S/BS) were measured on Goldner-stained sections. The measurement ROI was located within the medullary area directly facing the cortical defect, in longitudinal sections of operated femurs (see Figs. 2a, 3a).

#### High-resolution $\mu$ CT

Fixed dissected bones were scanned in ethanol with a high-resolution  $\mu$ CT (Viva CT40, Scanco Medical, Bassersdorf, Switzerland). 185



**Fig. 1.** MRI imaging of cortical bone repair. (a) Experimental set-up for long bone MRI imaging. See *Materials and methods* for details. (b) Schematic of the surgical procedure and anatomical location of cortical defects. (c) Coronal view of the mouse leg obtained with the 62  $\mu\text{m}$  FLASH 3D sequence on a control mouse. (d) Imaging from longitudinal MR acquisitions of the kinetics of bone repair in the same BSP+/+ mouse 6 (d6), 15 and 21 days after surgery. The edges and median axis of hole drilling/quantification area are respectively materialized with continuous and dotted lines. Bars = 1 mm.

186 The ROI measured encompassed the defect cortical area of isolated  
 187 operated femur, or the corresponding area of the left, unoperated  
 188 femur of the same mouse. Data were acquired at 55 KeV, with a  
 189  $10\ \mu\text{m}$  cubic resolution. Three-dimensional reconstructions of cortical  
 190 bone were generated using the following parameters: sigma: 12,  
 191 support: 2, threshold: 280. The bone volume fraction was calculated  
 192 directly by plotting gray voxels representing the bone fraction against  
 193 gray plus black voxels (non-bone objects) (VOX BV/TV). Cortical  
 194 bone repair was quantified by calculating the percent of porosity  
 195 ( $=100 - \text{BV/TV}$ ).

#### 196 Statistical analysis

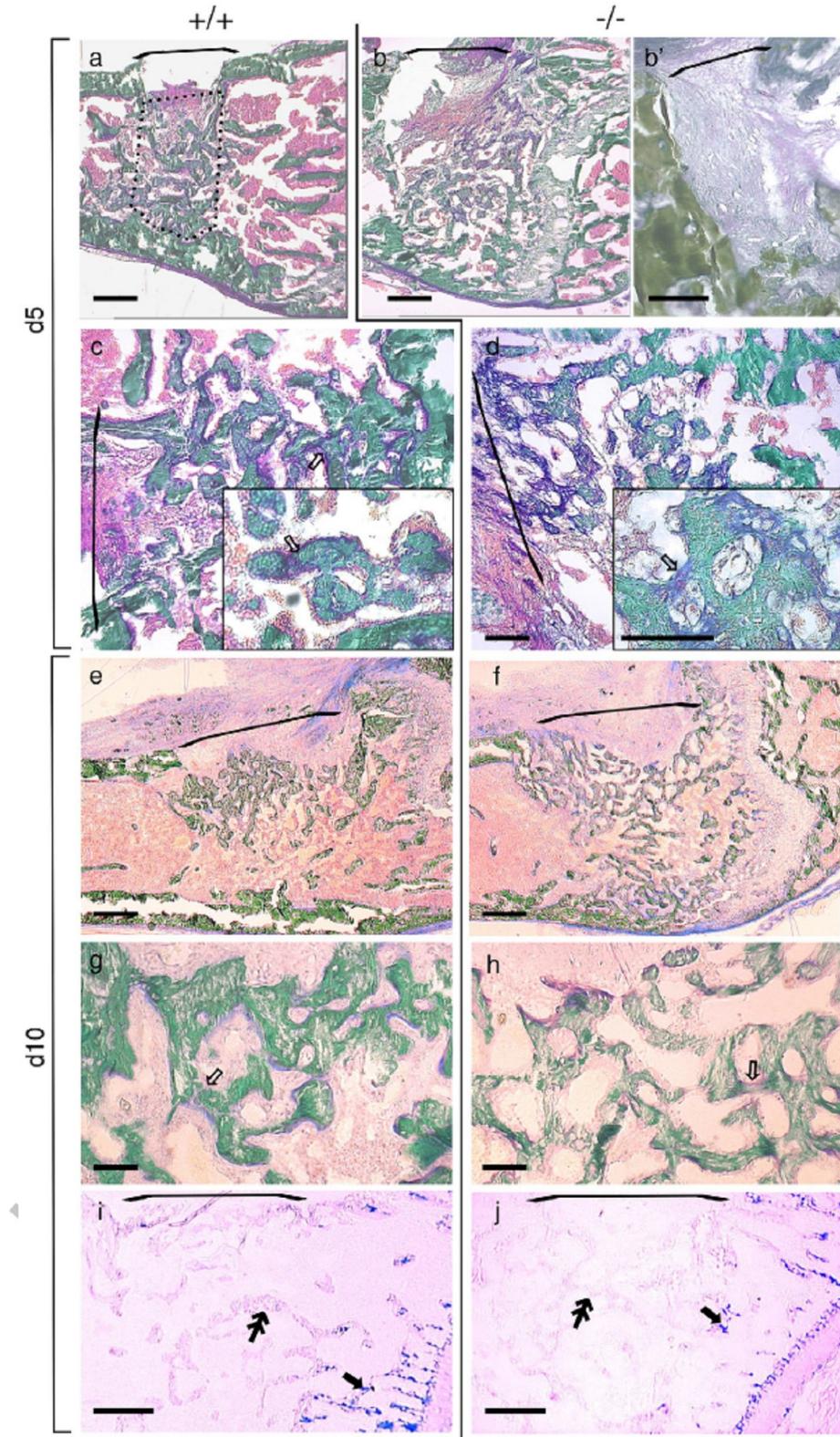
197  $\mu\text{CT}$  data were assessed by two way (side and genotype) ANOVA  
 198 with post-test and histomorphometry data with Student *t*-test, using  
 199 the STATISTICA software (StatSoft, Tulsa, OK, USA).

## 200 Results

### 201 Morphological follow-up of defect repair

In this study, we took advantage of the fact that MRI now offers 202  
 safe and non-invasive in vivo imaging of bone in mouse to perform a 203  
 temporal analysis of cortical defect repair. As shown in sagittal views 204  
 (Figs. 1c, d), the imaging procedure designed for our study allowed a 205  
 $62\ \mu\text{m}$  voxel imaging of the mouse long bones, a resolution sufficient 206  
 to image the defect in the femur and document the medullary 207  
 development of repair bone and the progressive refilling of the 208  
 cortical gap (Fig. 1d). Histology confirmed that the successive stages of 209  
 cortical repair were observed in both genotypes and that, as 210  
 previously described by others [30], repair of the defect proper took 211  
 place exclusively through intramembranous ossification, as shown by 212  
 the absence of cartilage within newly deposited bone (in Figs. 2i and j, 213

Please cite this article as: Malaval L, et al., Absence of bone sialoprotein (BSP) impairs cortical defect repair in mouse long bone, *Bone* (2009), doi:10.1016/j.bone.2009.06.005



Please cite this article as: Malaval L, et al., Absence of bone sialoprotein (BSP) impairs cortical defect repair in mouse long bone, Bone (2009), doi:10.1016/j.bone.2009.06.005

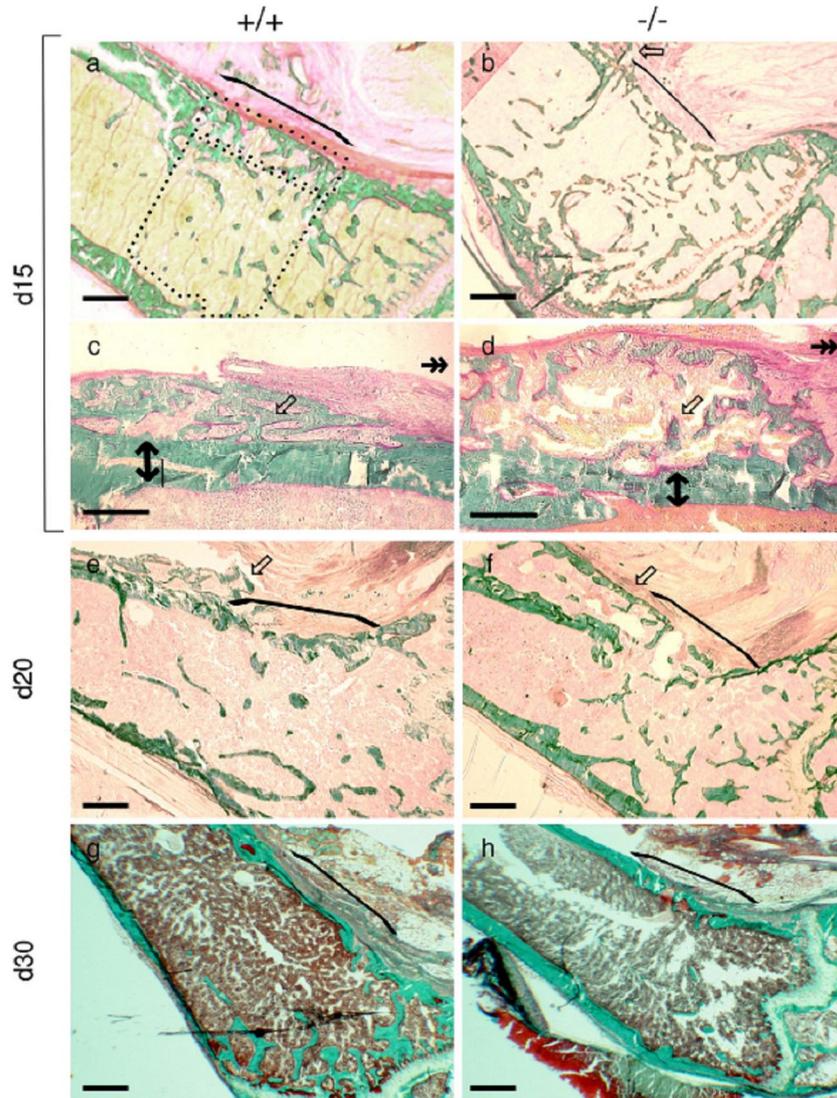


Fig. 3. Histology of late cortical bone repair in BSP<sup>+/+</sup> and <sup>-/-</sup> mice. (a, b, e, f) Masson's trichrome staining, (g, h) hematoxyline/trichrome staining of the cortical defect area in the femurs of <sup>+/+</sup> and <sup>-/-</sup> mice, 15 (d15), 20 and 30 days after operation. (c, d) Masson's trichrome staining of the endochondral osteogenic reaction in the periosteum adjacent to the cortical defect, fully ossified at this stage (empty arrows, also in b, e, f); the up-down arrows encompass the cortical bone, the double arrows point to the direction the defect area. Mineralized bone is in green and osteoid in purple, brackets delineate the cortical defect area, and the box in (a) delineates the target areas for MRI and  $\mu$ CT quantitation (repairing cortical defect) and histomorphometry (transient repair bone in the medulla). Bars = 400  $\mu$ m. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

214 alcian blue stains the growth plate—black arrow—not repair bone—  
215 double arrow). At day 5, the cortical defects were still patent (Figs. 2a,  
216 b), and the medulla adjacent to the defect in BSP<sup>+/+</sup> mice was filled

with primary bone matrix (Fig. 2a), only partly mineralized (Fig. 2c). 217  
In BSP<sup>-/-</sup> mice, medullar repair bone was either nearly absent (Fig. 218  
2b') or massively unmineralized (Figs. 2b, d). Mineralization of 219

Fig. 2. Histology of early cortical bone repair in BSP<sup>+/+</sup> and <sup>-/-</sup> mice. (a–h) Masson's trichrome staining, (i, j) alcian blue staining of the cortical defect area in the femurs of <sup>+/+</sup> and <sup>-/-</sup> mice, 5 (d5) and 10 days after operation; mineralized bone is in green and osteoid in purple. Five days after operation, primary bone matrix is being laid down in the medulla facing the defect in BSP<sup>+/+</sup> (a, c) and some (b') BSP<sup>-/-</sup> mice. Mineralization of the primary bone matrix is very low in BSP<sup>-/-</sup> mice (b, d), as compared to BSP<sup>+/+</sup> (a, c). At day 10, part of the matrix of repair bone is still unmineralized (e–h). (i, j) Cartilage (black arrows) is absent from the bone (double arrows) laid down in the defect area. Brackets delineate the cortical defect areas, the box in (a) delineates the target areas for histomorphometry (transient repair bone in the medulla), and empty arrows indicate areas of unmineralized matrix. Bars = 400  $\mu$ m, except in c, d = 200  $\mu$ m. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

Please cite this article as: Malaval L, et al., Absence of bone sialoprotein (BSP) impairs cortical defect repair in mouse long bone, Bone (2009), doi:10.1016/j.bone.2009.06.005

transient medullary bone increased progressively with time (Figs. 2, 3), with still more unmineralized matrix in mutants at day 10 (Figs. 2f, g) and day 15 (see also Figs. 6c, d). This transient repair bone was progressively resorbed, disappearing from the shaft and being replaced in the cortex with secondary bone, in way of closing up at day 15 in BSP+/+ mice (Fig. 3a). However, cortical repair was clearly delayed at this stage and later on in operated mutants, with both a higher cortical porosity in mutant versus wild type mice (compare Figs. 2e with 2f; 3a, 3e and 3g with 3b, 3f and 3h, respectively), and more residual primary bone in the medulla at least at days 10 and 15 (Figs. 2e, f, 3a, b and below). Of note, and as described [30], the periosteal area adjacent to the defect on the hip side showed an endochondral-type ossification process, with a temporal succession of cartilage, hypertrophic and mineralized cartilage, primary bone and remodeled, secondary bone (shown in Figs. 3c, d), resulting in some cases in the appearance of a duplicate cortical bone (Fig. 3f), later resorbed. We did not observe any difference in time course or extent of this off-site ossification process between BSP+/+ and -/- animals (not shown). Reconstruction of the cortical wall defect was nearly complete at day 30 (Figs. 3g, h).

#### Quantification of cortical bone tissue repair

240

The measurement of CV factor, which is related to the bone volume fraction, showed ~50% reduction for both +/+ and -/- mice in the middle of the cortex defect area 3 days after surgery, with progressively higher values towards the edges (Fig. 4a). CV then increased for both genotypes at day 8, mostly at the periphery of the defect. However, while CV reached an almost normal value 21 days after surgery throughout the defect area in +/+ mice, values were only slightly higher than at day 8 in -/- mice at the same time point (Fig. 4a), reflecting lack of repair of the cortical defect, as shown in Fig. 4b.  $\mu$ CT analysis of cortical mineral at day 15 confirmed these observations; cortical porosity of the defect area at day 15 was ~40% higher in -/- than in +/+ mice (Fig. 5), confirming that absence of BSP delays the repair of wounded femurs.

#### Quantification of medullary bone deposition and remodeling

254

The amount of mineralized primary repair bone (BV/TV) in the medulla of BSP+/+ mice, as measured by histomorphometry, was

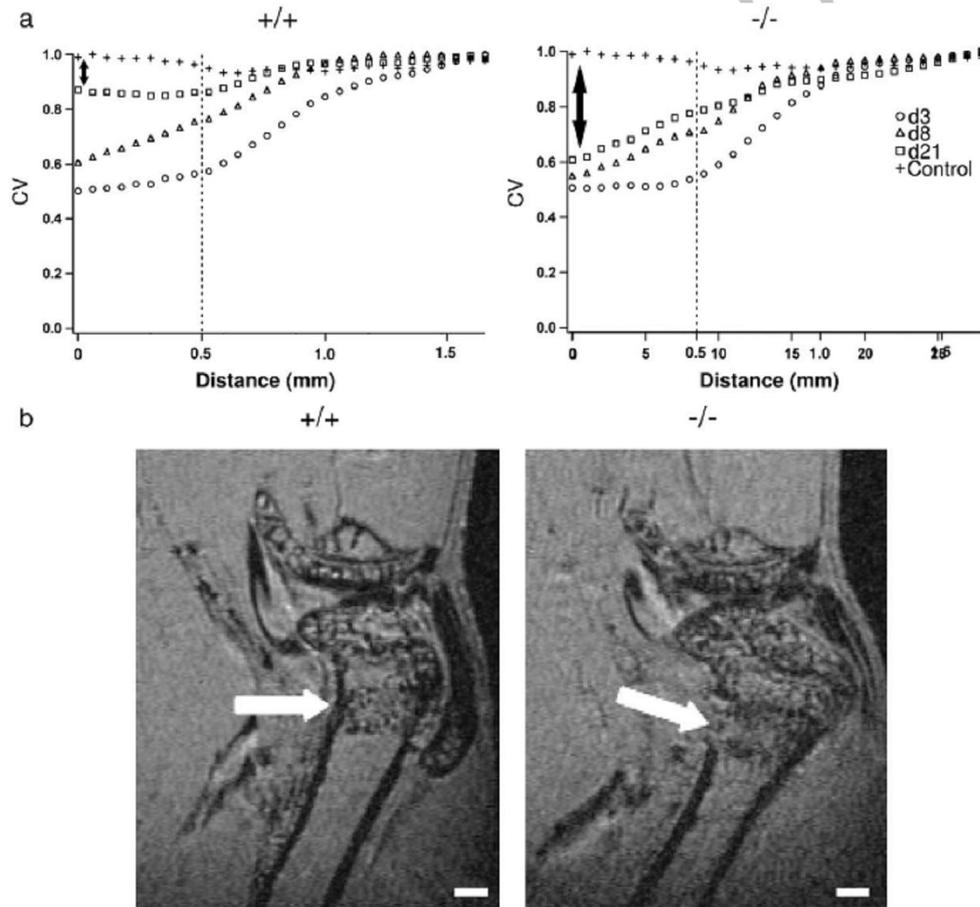


Fig. 4. In vivo MRI quantification of bone repair in BSP+/+ and -/- mice. (a) MRI quantification and (b) images at day 21 of bone regeneration in one operated -/- and one +/+ mouse, performed as described in Materials and methods. 3 (round symbols), 8 (triangles) and 21 days (square symbols) after surgery. Crosses give values for control (unoperated) bone. The abscissa gives the distance from the center of the defect, whose limit is marked by dashed vertical bars. Double arrows in (a) highlight the lower CV index in the central area of BSP-/- defects at d21; arrows in (b) indicate the defect zone. Bars = 1 mm.

Please cite this article as: Malaval L, et al., Absence of bone sialoprotein (BSP) impairs cortical defect repair in mouse long bone, Bone (2009), doi:10.1016/j.bone.2009.06.005

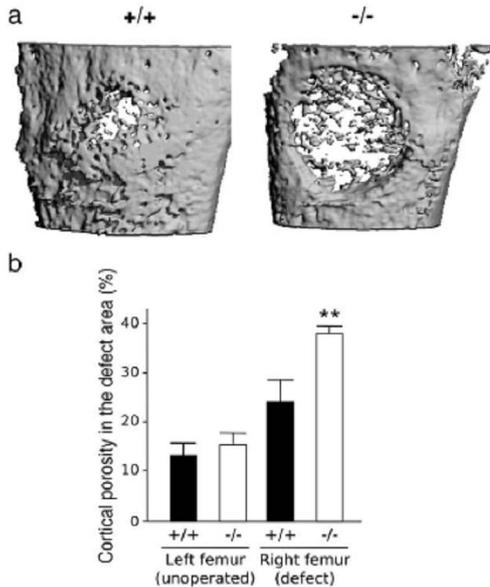


Fig. 5.  $\mu$ CT analysis of cortical defects and porosity quantification in BSP $^{+/+}$  and  $^{-/-}$  mice. Bone mineral was imaged (a) and porosity quantified (b) by  $\mu$ CT in the defect area of operated (right) femurs and the same area in matched unoperated (left) femurs of  $+/+$  and  $-/-$  mice, 15 days after operation. Values are mean  $\pm$  SEM of  $N=6$  mice. \*\*:  $p<0.01$  vs. matched  $+/+$ .

257 highest at day 5 and decreased progressively at days 10 and 15, with  
 258 concomitant decrease of trabecular numbers (TbN) and increase in  
 259 trabecular separation (TbSp, Fig. 6a). In contrast, average BV/TV was  
 260 very low in BSP $^{-/-}$  wounded femurs at day 5, due to interindividual  
 261 variability of response and low degree of mineralization. This resulted  
 262 in a lower number of trabeculae (TbN), and higher trabecular  
 263 separation (TbSp). The volume of medullar repair bone in mutants  
 264 increased at day 10, however, when it was higher than in BSP $^{+/+}$   
 265 mice, then decreased again at day 15, but still with higher values (Fig.  
 266 6a). This reflected in higher TbN and lower TbSp values, (the latter non  
 267 significant at day 15; Fig. 6a). No significant difference in trabecular  
 268 thickness was observed (not shown). At day 15 (Fig. 6b), repair bone  
 269 in mutants showed lower bone formation with significantly decreased  
 270 surfaces of active osteoblast (Ob.S/BS, see Figs. 6c, f) as well as osteoid  
 271 surfaces (OS/BS). Also, while the number of osteoclasts lining bone  
 272 trabeculae was not significantly different in  $-/-$  and  $+/+$  mice (Oc.  
 273 N/BS, not shown), measurement of osteoclast contact surfaces (Oc.S/  
 274 BS) and osteoclast length (Oc.Le/BS) showed reduced values in  $-/-$   
 275 mice (Fig. 6b) reflecting visibly shorter osteoclast contacts with the  
 276 bone surface in mutants (Figs. 6g–j).

## 277 Discussion

278 Few previous studies have applied MRI to the mouse skeleton, and  
 279 those reported are mostly *ex vivo* for developmental [16] and  
 280 bioengineering [7,26] studies. In the present work, we show that an  
 281 *in vivo*, longitudinal MRI approach allows a temporal analysis of long  
 282 bone repair in mice, providing both qualitative and quantitative data.  
 283 Although significantly more time-consuming than  $\mu$ CT, MRI has the  
 284 advantage of being a non-radiative technique, free of the potential  
 285 effects of recurrent exposure to X-rays on bone cell activity, which  
 286 may result from repeated  $\mu$ CT imaging on the same animal [3]. Also in  
 287 contrast to  $\mu$ CT, because of its “negative” character (mineralized bone  
 288 appears as dark, undetected areas) MRI is not sensitive to mineral

density, which may be an issue when the mineralization process is 289  
 affected (see below). 290

To test the ability of BSP $^{-/-}$  mice to repair bone, we chose the 291  
 cortical defect model previously characterized in rat femur [29], as 292  
 well as mouse femur [30] and tibia [4]. As a bone repair model, 293  
 cortical defects are simple and geometrically easy to reproduce and 294  
 quantify. One reason is that repair is in this case a pure membrane 295  
 bone process [30], as opposed to the “recapitulation of endochondral 296  
 development” [11] observed in the commonly used closed fractures, 297  
 which involves endochondral ossification in a more complex cellular 298  
 and morphological configuration [18]. An endochondral process does 299  
 occur after a mouse cortical defect, but it is located to the 300  
 periosteum outside the defect area. This cycle of osteogenesis is 301  
 likely triggered by the local increase in mechanical load, as discussed 302  
 in detail by Usitalo et al. [30]. The simple design of the repair area 303  
 proper allowed us to quantify bone defect filling within the damaged 304  
 cortex, and to assess remodeling of repair bone within the adjacent 305  
 medullary area. 306

In a previous report [20], we described the bone phenotype of 307  
 BSP $^{-/-}$  mice, which is characterized in 4-month-old animals by a 308  
 reduced body size, with undermineralized bone and thinner cortices. 309  
 In contrast, trabecular bone volume is higher in BSP $^{-/-}$  mice, albeit 310  
 with low bone formation and reduced osteoclast numbers and 311  
 surfaces, the overall phenotype suggesting that both cell lineages 312  
 are affected by the absence of BSP, resulting in slow bone turnover in 313  
 young adult mice. Consistent with this, we have now documented by 314  
 several techniques a slower repair of drill holes in BSP $^{-/-}$  mouse 315  
 cortices. Concomitant with impaired filling of the drill wound, we also 316  
 observed a delayed time course of repair bone building and resorption 317  
 in the medullary area of BSP $^{-/-}$  mice. This reflected first in a lower 318  
 BV/TV at day 5 (Fig. 6a), due to both the variable degree of fill-up of 319  
 the defect in BSP $^{-/-}$  mice at this stage (Figs. 2b, b') and the 320  
 hypomineralization of the mutant matrix (Fig. 2d). We previously 321  
 showed that mineralized nodule formation is reduced in cultures of 322  
 BSP $^{-/-}$  bone marrow [20], along with the expression of osteoblastic 323  
 markers, indicating that primary matrix laying and/or other osteo- 324  
 blast activities are altered in the absence of BSP. Although repair bone 325  
 is still hypomineralized in operated BSP $^{-/-}$  mice at day 10 and day 326  
 15, its volume is higher than in BSP $^{+/+}$  mice, confirming that the 327  
 mutant phenotype reflects more than a mineralization defect. Indeed, 328  
 while the number of osteoclasts lining the repair bone was not 329  
 different in  $+/+$  and  $-/-$  mice, osteoclast surfaces and length were 330  
 significantly reduced in mutants. Reduced osteoclast length was 331  
 previously observed in remodeling secondary trabecular bone of 332  
 BSP $^{-/-}$  mice, and may indicate impaired resorptive activity [20]. We 333  
 also previously found that although bone formation surfaces (tetra- 334  
 cycline-labeled or covered with active osteoblasts) are lower in the 335  
 trabecular metaphysis of  $-/-$  mice, osteoid surfaces (OS/BS) are 336  
 higher than in  $+/+$  mice, due to delayed mineralization [20]. In the 337  
 primary repair bone studied here, the rate of matrix deposition 338  
 outpaces mineralization (as shown by high osteoid values in both 339  
 genotypes, cf. Fig. 6b) and OS/BS primarily reflects osteogenic activity. 340  
 OS/BS is thus reduced in  $-/-$  mice along with active osteoblast 341  
 surfaces, although these are still much higher than in secondary bone 342  
 [20]. Overall, repair bone of BSP $^{-/-}$  mice displays a slower bone 343  
 turnover which may explain the delay in defect repair. 344

Knockout of the cognate protein OPN generates a mouse 345  
 phenotype which has been amply described [6,17,31] and reflects 346  
 essentially a defect in osteoclast cell–matrix interaction through lack 347  
 of the appropriate ligand for, in particular, integrin  $\alpha v \beta 3$  [6]. This 348  
 results in impaired resorption, mostly evidenced by a lack of bone loss 349  
 under challenges such as hind leg unloading [17] or ovariectomy [31]. 350  
 Several studies report a higher trabecular bone volume in mice lacking 351  
 OPN, similar to BSP $^{-/-}$  [6,13]. Interestingly, we previously showed 352  
 that unloaded BSP $^{-/-}$  mice lose trabecular bone, indicating that the 353  
 constitutively reduced bone turnover of these mutants can be 354

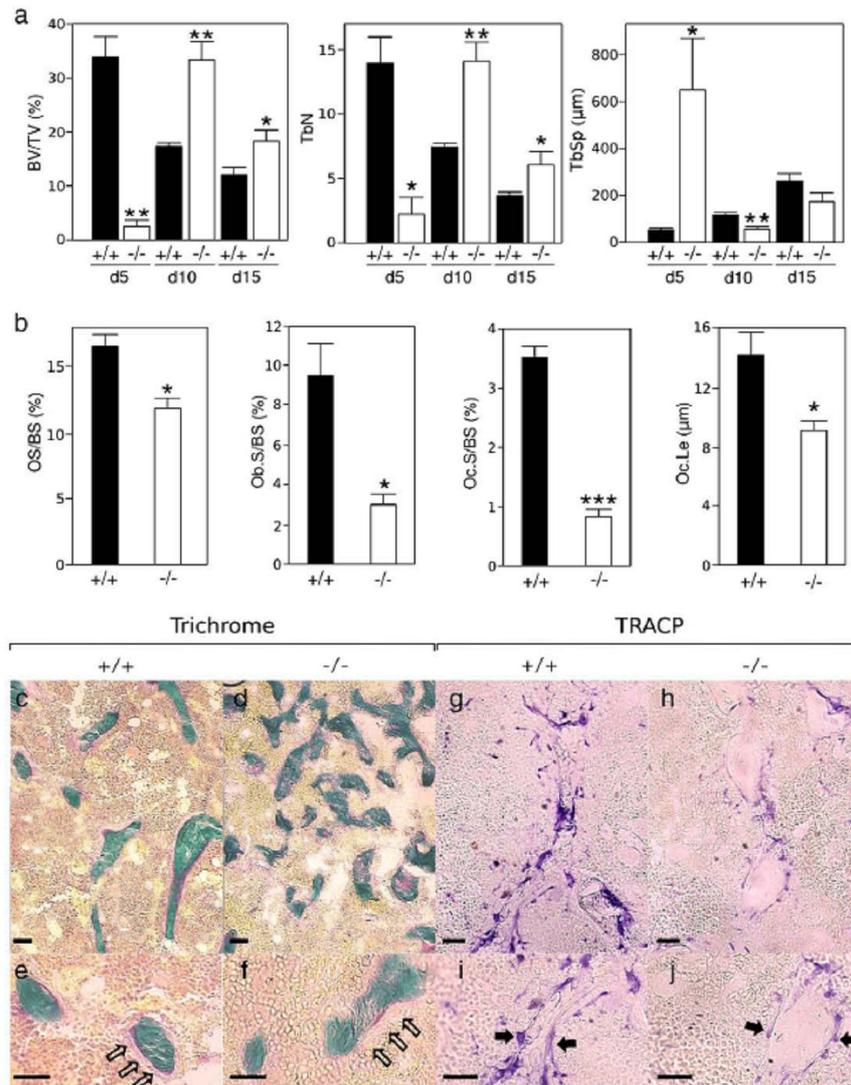


Fig. 6. Histomorphometric analysis of repair bone in BSP +/+ and -/- mice 15 days after surgery. (a) Structural parameters of repair-filling primary bone measured 5 (d5), 10 and 15 days after operation, and (b) cellular parameters measured at day 15. Values are mean  $\pm$  SEM of  $N=3$  (days 5, 10) or 6 (day 15) mice. \*:  $p<0.05$ , \*\*:  $p<0.01$ , \*\*\*:  $p<0.001$  vs. +/+. See Materials and methods for details. (c-f) Masson's trichrome (mineralized bone in green and osteoid in purple) and (g-j) TRACP staining (for osteoclasts) of repair bone in +/+ and -/- mice. White arrows in (c, f) delineate cuboidal (plump) osteoblasts lining osteoid matrix, black arrows in (i, j) indicate osteoclasts. Bars = 200  $\mu$ m. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

355 stimulated by a mechanical challenge [20]. In their recent study of  
 356 closed femoral fractures in OPN -/- mice, Duvall et al. [8] reported a  
 357 delayed neovascularization in fractured mutants, with slower callus  
 358 growth but bigger callus size at 56 days, the latter resulting from  
 359 slower callus remodeling. Although differences between the two  
 360 models make direct comparisons difficult, similar remodeling delays  
 361 in OPN and BSP knockout bone repair process appear to reflect the  
 362 impairment of (at least) resorptive activity in both cases. This defect is  
 363 constitutive in OPN -/- osteoclasts [6] while formation and resorption  
 364 are stimulated in BSP -/- mice by tail suspension [20]. That this  
 365 is not the case in bone repair may be due to the role in this process of

primary bone, in which BSP is more abundant and may play a 366  
 fundamental role [12,21]. 367

While both studies underline the importance of OPN and BSP in 368  
 tissue and organ remodeling and repair, a fair comparison between 369  
 the two knockouts will require challenging in the same model, and 370  
 extending the study on BSP -/- mice to aspects of the repair process 371  
 not analyzed here, such as neovascularization, which is impaired in 372  
 fractured OPN -/- mice [8] and in which BSP might be involved [1]. 373  
 The cortical defect model provides a simple and easily normalized 374  
 tool for such a parallel study, which is presently underway in our 375  
 laboratories [22]. 376

Please cite this article as: Malaval L, et al., Absence of bone sialoprotein (BSP) impairs cortical defect repair in mouse long bone, Bone (2009), doi:10.1016/j.bone.2009.06.005

## 377 Acknowledgments

378 The authors thank the "Laboratoire de Transgènèse, Service  
379 Commun de l'Université de Bordeaux II", most specially M. P. Costet,  
380 for the care of animals.

## 381 References

- 382 [1] Bellahcene A, Bonjean K, Fohr B, Fedarko NS, Robey FA, Young MF, et al. Bone  
383 sialoprotein mediates human endothelial cell attachment and migration and  
384 promotes angiogenesis. *Circ Res* 2000;86:885–91.
- 385 [2] Bellahcene A, Castronovo V, Ogbureke KU, Fisher LW, Fedarko NS. Small integrin-  
386 binding ligand N-linked glycoproteins (SIBLINGs): multifunctional proteins in  
387 cancer. *Nat Rev Cancer* 2008;8:212–26.
- 388 [3] Boudignon B, Orwoll B, Bilke D, Nissenson RA, Kurimoto P, Halloran B. Effects of  
389 microCT radiation on bone metabolism. *J Bone Miner Res* 2006;22:SU089.
- 390 [4] Campbell TM, Wong WT, Mackie EJ. Establishment of a model of cortical bone  
391 repair in mice. *Calcif Tissue Int* 2003;73:49–55.
- 392 [5] Candelieri GA, Liu F, Aubin JE. Individual osteoblasts in the developing calvaria  
393 express different gene repertoires. *Bone* 2001;28:351–61.
- 394 [6] Chellaiah MA, Kizer N, Biswas R, Alvarez U, Strauss-Schoenberger J, Rifas L, et al.  
395 Osteopontin deficiency produces osteoclast dysfunction due to reduced CD44  
396 surface expression. *Mol Biol Cell* 2003;14:173–89.
- 397 [7] Chesnick IE, Avallone FA, Leapman RD, Landis WJ, Eidelman N, Potter K. Evaluation  
398 of bioreactor-cultivated bone by magnetic resonance microscopy and FTIR  
399 microspectroscopy. *Bone* 2007;40:904–12.
- 400 [8] Duvall CL, Taylor WR, Weiss D, Wojtowicz AM, Goldberg RE. Impaired angiogen-  
401 esis, early callus formation, and late stage remodeling in fracture healing of  
402 osteopontin-deficient mice. *J Bone Miner Res* 2007;22:286–97.
- 403 [9] Fisher LW, Fedarko NS. Six genes expressed in bones and teeth encode the current  
404 members of the SIBLING family of proteins. *Connect Tissue Res* 2003;44(Suppl. 1):  
405 33–40.
- 406 [10] Ganss B, Kim RH, Sodek J. Bone sialoprotein. *Crit Rev Oral Biol Med* 1999;10:79–98.
- 407 [11] Gerstenfeld LC, Cullinane DM, Barnes GL, Graves DT, Einhorn TA. Fracture healing  
408 as a post-natal developmental process: molecular, spatial, and temporal aspects  
409 of its regulation. *J Cell Biochem* 2003;88:873–84.
- 410 [12] Gorski JP. Is all bone the same? Distinctive distributions and properties of non-  
411 collagenous matrix proteins in lamellar vs. woven bone imply the existence of  
412 different underlying osteogenic mechanisms. *Crit Rev Oral Biol Med* 1998;9:  
413 201–23.
- 414 [13] Harmey D, Johnson KA, Zelken J, Camacho NP, Hoylearts MF, Noda M, et al.  
415 Elevated skeletal osteopontin levels contribute to the hypophosphatasia pheno-  
416 type in *Akp2*( $-/-$ ) mice. *J Bone Miner Res* 2006;21:1377–86.
- 417 [14] Hogan BL, Blessing M, Winnier GE, Suzuki N, Jones CM. Growth factors in  
418 development: the role of TGF-beta related polypeptide signalling molecules in  
419 embryogenesis. *Dev Suppl* 1994;53–60.
- 469 [15] Hunter GK, Kyle CL, Goldberg HA. Modulation of crystal formation by bone  
420 phosphoproteins: structural specificity of the osteopontin-mediated inhibition of  
421 hydroxyapatite formation. *Biochem J* 1994;300(Pt 3):723–8.
- 422 [16] Ichikawa Y, Sumi M, Ohwatari N, Komori T, Sumi T, Shibata H, et al. Evaluation of  
423 9.4-T MR microimaging in assessing normal and defective fetal bone development:  
424 comparison of MR imaging and histological findings. *Bone* 2004;34:619–28.
- 425 [17] Ishijima M, Rittling SR, Yamashita T, Tsuji K, Kurosawa H, Nifuji A, et al. 426  
427 Enhancement of osteoclastic bone resorption and suppression of osteoblastic  
428 bone formation in response to reduced mechanical stress do not occur in the  
429 absence of osteopontin. *J Exp Med* 2001;193:399–404.
- 430 [18] Lacroix D, Prendergast PJ. A mechano-regulation model for tissue differentiation  
431 during fracture healing: analysis of gap size and loading. *J Biomech* 2002;35:  
432 1163–71.
- 433 [19] Malaval L, Liu F, Roche P, Aubin JE. Kinetics of osteoprogenitor proliferation and  
434 osteoblast differentiation in vitro. *J Cell Biochem* 1999;74:616–27.
- 435 [20] Malaval L, Wade-Gueye NM, Boudiffa M, Fei J, Zirngibl R, Chen F, et al. Bone  
436 sialoprotein plays a functional role in bone formation and osteoclastogenesis. *J Exp*  
437 *Med* 2008;205:1145–53.
- 438 [21] Midura RJ, Wang A, Lovitch D, Law D, Powell K, Gorski JP. Bone acidic glycoprotein-  
439 75 delineates the extracellular sites of future bone sialoprotein accumulation and  
440 apatite nucleation in osteoblastic cultures. *J Biol Chem* 2004;279:25464–73.
- 441 [22] L. Monfoulet J, Fricain L, Malaval JE, Aubin, and O. Chassande. Implication of Two  
442 Matrix Proteins in Bone Healing: Osteopontin (OPN) and Bone Sialoprotein (BSP).  
443 pp. M160; 2007.
- 444 [23] Nagy A, Rossant J, Nagy R, Abramow-Newerly W, Roder JC. Derivation of  
445 completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells.  
446 *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90:8424–8.
- 447 [24] Ogbureke KU, Fisher LW. Expression of SIBLINGs and their partner MMPs in  
448 salivary glands. *J Dent Res* 2004;83:664–70.
- 449 [25] Ogbureke KU, Fisher LW. Renal expression of SIBLING proteins and their partner  
450 matrix metalloproteinases (MMPs). *Kidney Int* 2005;68:155–66.
- 451 [26] Potter K, Sweet DE, Anderson P, Davis GR, Isogai N, Asamura S, et al. Non-  
452 destructive studies of tissue-engineered phalanges by magnetic resonance  
453 microscopy and X-ray microtomography. *Bone* 2006;38:350–8.
- 454 [27] Riminucci M, Silvestrini G, Bonucci E, Fisher LW, Gehron Robey P, Bianco P. The  
455 anatomy of bone sialoprotein immunoreactive sites in bone as revealed by  
456 combined ultrastructural histochemistry and immunohistochemistry. *Calcif Tissue*  
457 *Int* 1995;57:277–84.
- 458 [28] Sodek J, Ganss B, McKee MD. Osteopontin. *Crit Rev Oral Biol Med* 2000;11:  
459 279–303.
- 460 [29] Uchida S, Doi Y, Kudo H, Funakawa H, Nakamura T, Fujimoto S. Transient  
461 expression of activin betaA mRNA on osteoprogenitor cells in rat bone  
462 regeneration after drill-hole injury. *Bone* 2000;27:81–90.
- 463 [30] Uusitalo H, Rantakokko J, Ahonen M, Jamsa T, Tuukkanen J, Kahari V, et al. A  
464 metaphyseal defect model of the femur for studies of murine bone healing. *Bone*  
465 2001;28:423–9.
- 466 [31] Yoshitake H, Rittling SR, Denhardt DT, Noda M. Osteopontin-deficient mice are  
467 resistant to ovariectomy-induced bone resorption. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;  
468 96:8156–60.

Please cite this article as: Malaval L, et al., Absence of bone sialoprotein (BSP) impairs cortical defect repair in mouse long bone, *Bone* (2009), doi:10.1016/j.bone.2009.06.005

## **Communications Scientifiques**

---

## Publications

Absence of bone sialoprotein (BSP) impairs cortical defect repair in mouse long bone.  
Malaval L., Monfoulet L., Fabre T., Pothuaud L., Bareille R., Miraux S., Thiaudiere E., Raffard G., Franconi J. M., Lafage-Proust M. H., Aubin J. E., Vico L., Amedee J.  
Bone 2009 Jun 12. [Epub ahead of print]

Drilled hole defects in mouse femur as models of intramembranous cortical and cancellous bone regeneration.

Monfoulet L.; Rabier B., Chassande O., Fricain J. C.

Accepté pour publication dans *Calcified Tissue International*

BSP but not OPN deficiency, impairs the mineralization of regenerating bone during cortical defect healing.

Monfoulet L., Malaval L., Aubin J.E., Rittling S.R., Gadeau A.P., Fricain J.C., Chassande O.

Accepté pour publication dans *Bone*

OPN but not BSP deficiency, altered bone regeneration patterns in an epi-metaphyseal defect in mouse femur.

Monfoulet L., Malaval L., Aubin J.E., Rittling S.R., Gadeau A.P., Fricain J.C., Chassande O.

(*En préparation*)

ERR $\alpha$  modulates age and sex hormone-related bone mass in female but not male mice.

Gallet M., Teyssier C., Rabier B., Monfoulet L., Dine J., Espellergues J., Horard B., Giguère V., Chassande O., Vanacker J.M.

Accepté pour publication dans *PLoS ONE*

## Communications orales (\* : orateur)

Les sphérulites CHOL-TOE-BP : un système de délivrance osseux.

Monfoulet L.\*, Hengst V, Chassande O.

11<sup>èmes</sup> Journées Françaises de Biologie des Tissus Minéralisés (JFBTM), Nice-France, 19-21 mars 2009 (récompensée par un prix)

ERR $\alpha$  modulates age and sex hormone-related bone mass in female but not male mice.

Gallet M.\*, Teyssier C., Rabier B., Monfoulet L., Dine J., Espellergues J., Horard B., Giguère V., Chassande O., Vanacker J.M.

11<sup>èmes</sup> Journées Françaises de Biologie des Tissus Minéralisés (JFBTM), Nice-France, 19-21 Mars 2009

L'hormone thyroïdienne induit une forte et rapide perte osseuse par inhibition de la formation et activation de la résorption : analyse de la nature des récepteurs impliqués.

Rabier B., Dacquin R., Monfoulet L., Malaval L., Chassande O.\*

11<sup>èmes</sup> Journées Françaises de Biologie des Tissus Minéralisés (JFBTM), Nice-France, 19-21 Mars 2009

Involvement of two bone matrix proteins in cortical bone healing: Osteopontin and Bone Sialoprotein

Monfoulet L.\*, Malaval L., Fricain J-C, Aubin J-E, Chassande O.

European Calcified Tissue Society (ECTS) 35<sup>th</sup> Annual Meeting, Barcelona-Spain, 24-28 May 2008.

Implication des protéines matricielles dans la réparation osseuse : l'ostéopontine et la sialoprotéine osseuse

Monfoulet L.\*, Fricain J-C., Gadeau A., Malaval L., Chassande O.

10<sup>èmes</sup> Journées Françaises de Biologie des Tissus Minéralisés (JFBTM), St Valéry sur Somme-France, 24-26 Mai 2007.

### **Communications affichées**

A bone defect model in mouse femur to challenge biomaterials, cells and molecules for bone repair.

Monfoulet L., Fricain J-C., Rabier B., Amédée J., Chassande O.

American Society of Bone and Mineral Research (ASBMR), 30th Annual Meeting, Montréal Canada, September 12-16, 2008. JBMR suppl August 2008: SA126-s158.

Implication of Two Matrix Proteins in Bone Healing: Osteopontin (OPN) and Bone Sialoprotein (BSP)

Monfoulet L., Fricain J.C., Malaval L., Aubin J.E., Chassade O.

American Society of Bone and Mineral Research (ASBMR) 29th Annual Meeting, Honolulu, Hawaii, USA, September 14-19, 2007. JBMR, 2007;22 suppl 1:S160-s160.

Implication de l'ostéopontine dans la réparation naturelle d'un défaut osseux chez la souris.

Monfoulet L., Fricain J.C., Chassade O.

9<sup>èmes</sup> Journées Françaises de Biologie des Tissus Minéralisés (JFBTM), Lyon, France, 18-20 mai 2006 (récompensée par un prix)

# Bibliographie

---

- Aaron, J. E., B. Oliver, et al. (1999). "Calcified microspheres as biological entities and their isolation from bone." Histochem J **31**(7): 455-70.
- Aitken, C. J., J. M. Hodge, et al. (2004). "Adenoviral down-regulation of osteopontin inhibits human osteoclast differentiation in vitro." J Cell Biochem **93**(5): 896-903.
- Akiyama, H. (2008). "Control of chondrogenesis by the transcription factor Sox9." Mod Rheumatol **18**(3): 213-9.
- Akiyama, H., M. C. Chaboissier, et al. (2002). "The transcription factor Sox9 has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway and is required for expression of Sox5 and Sox6." Genes Dev **16**(21): 2813-28.
- Alden, T. D., E. J. Beres, et al. (2000). "The use of bone morphogenetic protein gene therapy in craniofacial bone repair." J Craniofac Surg **11**(1): 24-30.
- Alford, A. I. and K. D. Hankenson (2006). "Matricellular proteins: Extracellular modulators of bone development, remodeling, and regeneration." Bone **38**(6): 749-57.
- Alkhiary, Y. M., L. C. Gerstenfeld, et al. (2005). "Enhancement of experimental fracture-healing by systemic administration of recombinant human parathyroid hormone (PTH 1-34)." J Bone Joint Surg Am **87**(4): 731-41.
- Allen, M. R., J. M. Hock, et al. (2004). "Periosteum: biology, regulation, and response to osteoporosis therapies." Bone **35**(5): 1003-12.
- Altman, A., Z. Hochberg, et al. (1992). "Interactions between growth hormone and dexamethasone in skeletal growth and bone structure of the young mouse." Calcif Tissue Int **51**(4): 298-304.
- Anderson, H. C. (1995). "Molecular biology of matrix vesicles." Clin Orthop Relat Res(314): 266-80.
- Anderson, H. C., R. Garimella, et al. (2005). "The role of matrix vesicles in growth plate development and biomineralization." Front Biosci **10**: 822-37.
- Andrew, J. G., J. A. Hoyland, et al. (1995). "Platelet-derived growth factor expression in normally healing human fractures." Bone **16**(4): 455-60.
- Angel, N. Z., N. Walsh, et al. (2000). "Transgenic mice overexpressing tartrate-resistant acid phosphatase exhibit an increased rate of bone turnover." J Bone Miner Res **15**(1): 103-10.
- Ariztia, E. V., V. Subbarao, et al. (2003). "Osteopontin contributes to hepatocyte growth factor-induced tumor growth and metastasis formation." Exp Cell Res **288**(2): 257-67.
- Asou, Y., S. R. Rittling, et al. (2001). "Osteopontin facilitates angiogenesis, accumulation of osteoclasts, and resorption in ectopic bone." Endocrinology **142**(3): 1325-32.
- Bai, X., D. Miao, et al. (2004). "Transgenic mice overexpressing human fibroblast growth factor 23 (R176Q) delineate a putative role for parathyroid hormone in renal phosphate wasting disorders." Endocrinology **145**(11): 5269-79.
- Baker, J., J. P. Liu, et al. (1993). "Role of insulin-like growth factors in embryonic and postnatal growth." Cell **75**(1): 73-82.
- Balcerzak, M., E. Hamade, et al. (2003). "The roles of annexins and alkaline phosphatase in mineralization process." Acta Biochim Pol **50**(4): 1019-38.
- Baron, R. E. (1996). Anatomy and Ultrastructure of Bone. Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism. L.-. Raven, Murray J. Favus, Sylvia Christakos, American Society for Bone and Mineral Research: 3-10.
- Barragan-Adjemian, C., D. Nicolella, et al. (2006). "Mechanism by which MLO-A5 late osteoblasts/early osteocytes mineralize in culture: similarities with mineralization of lamellar bone." Calcif Tissue Int **79**(5): 340-53.

- Basu, A., L. H. Kligman, et al. (2001). "Impaired wound healing in mice deficient in a matricellular protein SPARC (osteonectin, BM-40)." BMC Cell Biol **2**: 15.
- Beck, L. S., E. P. Amento, et al. (1993). "TGF-beta 1 induces bone closure of skull defects: temporal dynamics of bone formation in defects exposed to rhTGF-beta 1." J Bone Miner Res **8**(6): 753-61.
- Behonick, D. J., Z. Xing, et al. (2007). "Role of matrix metalloproteinase 13 in both endochondral and intramembranous ossification during skeletal regeneration." PLoS One **2**(11): e1150.
- Behrend, E. I., A. M. Craig, et al. (1994). "Reduced malignancy of ras-transformed NIH 3T3 cells expressing antisense osteopontin RNA." Cancer Res **54**(3): 832-7.
- Bellahcene, A., V. Albert, et al. (1998). "Ectopic expression of bone sialoprotein in human thyroid cancer." Thyroid **8**(8): 637-41.
- Bellahcene, A., K. Bonjean, et al. (2000). "Bone sialoprotein mediates human endothelial cell attachment and migration and promotes angiogenesis." Circ Res **86**(8): 885-91.
- Bellahcene, A. and V. Castronovo (1997). "Expression of bone matrix proteins in human breast cancer: potential roles in microcalcification formation and in the genesis of bone metastases." Bull Cancer **84**(1): 17-24.
- Bellahcene, A., V. Castronovo, et al. (2008). "Small integrin-binding ligand N-linked glycoproteins (SIBLINGs): multifunctional proteins in cancer." Nat Rev Cancer **8**(3): 212-26.
- Bellahcene, A., N. Maloujahnoum, et al. (1997). "Expression of bone sialoprotein in human lung cancer." Calcif Tissue Int **61**(3): 183-8.
- Bellahcene, A., M. P. Merville, et al. (1994). "Expression of bone sialoprotein, a bone matrix protein, in human breast cancer." Cancer Res **54**(11): 2823-6.
- Ben-Ari, A., R. Rivkin, et al. (2009). "Isolation and Implantation of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells with Fibrin Micro Beads to Repair a Critical-Size Bone Defect in Mice." Tissue Eng Part A.
- Berman, J. S., D. Serlin, et al. (2004). "Altered bleomycin-induced lung fibrosis in osteopontin-deficient mice." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **286**(6): L1311-8.
- Bianco, P., M. Riminucci, et al. (2001). "Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications." Stem Cells **19**(3): 180-92.
- Blin-Wakkach, C., F. Bernard, et al. (2004). "[Osteopetrosis, from mouse to man]." Med Sci (Paris) **20**(1): 61-7.
- Bolander, M. E. (1992). "Regulation of fracture repair by growth factors." Proc Soc Exp Biol Med **200**(2): 165-70.
- Bonewald, L. F. (2007). "Osteocytes as dynamic multifunctional cells." Ann N Y Acad Sci **1116**: 281-90.
- Bonewald, L. F., S. L. Dallas, et al. (2009). Bone mineralisation. The skeletal system. P. O. New York, Cold Spring Harbor, Laboratory Press: 277-296.
- Bonewald, L. F. and G. R. Mundy (1990). "Role of transforming growth factor-beta in bone remodeling." Clin Orthop Relat Res(250): 261-76.
- Bonucci, E. (2002). "Crystal ghosts and biological mineralization: fancy spectres in an old castle, or neglected structures worthy of belief?" J Bone Miner Metab **20**(5): 249-65.
- Boskey, A. L. (1996). "Matrix proteins and mineralization: an overview." Connect Tissue Res **35**(1-4): 357-63.
- Boskey, A. L., S. Gadaleta, et al. (1998). "Fourier transform infrared microspectroscopic analysis of bones of osteocalcin-deficient mice provides insight into the function of osteocalcin." Bone **23**(3): 187-96.

- Boskey, A. L., D. J. Moore, et al. (2003). "Infrared analysis of the mineral and matrix in bones of osteonectin-null mice and their wildtype controls." J Bone Miner Res **18**(6): 1005-11.
- Boskey, A. L., L. Spevak, et al. (2002). "Osteopontin deficiency increases mineral content and mineral crystallinity in mouse bone." Calcif Tissue Int **71**(2): 145-54.
- Bostrom, M. P. and P. Asnis (1998). "Transforming growth factor beta in fracture repair." Clin Orthop Relat Res(355 Suppl): S124-31.
- Boyle, W. J., W. S. Simonet, et al. (2003). "Osteoclast differentiation and activation." Nature **423**(6937): 337-42.
- Bradshaw, A. D., M. J. Reed, et al. (2002). "SPARC-null mice exhibit accelerated cutaneous wound closure." J Histochem Cytochem **50**(1): 1-10.
- Breitbart, A. S., D. A. Grande, et al. (1998). "Tissue engineered bone repair of calvarial defects using cultured periosteal cells." Plast Reconstr Surg **101**(3): 567-74; discussion 575-6.
- Brenza, H. L., C. Kimmel-Jehan, et al. (1998). "Parathyroid hormone activation of the 25-hydroxyvitamin D3-1alpha-hydroxylase gene promoter." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(4): 1387-91.
- Brighton, C. T. (1984). "The biology of fracture repair." Instr Course Lect **33**: 60-82.
- Bruder, S. P., D. J. Fink, et al. (1994). "Mesenchymal stem cells in bone development, bone repair, and skeletal regeneration therapy." J Cell Biochem **56**(3): 283-94.
- Campbell, T. M., W. T. Wong, et al. (2003). "Establishment of a model of cortical bone repair in mice." Calcif Tissue Int **73**(1): 49-55.
- Canfield, A. E., C. Farrington, et al. (2002). "The involvement of matrix glycoproteins in vascular calcification and fibrosis: an immunohistochemical study." J Pathol **196**(2): 228-34.
- Carano, R. A. and E. H. Filvaroff (2003). "Angiogenesis and bone repair." Drug Discov Today **8**(21): 980-9.
- Carnoy, J.-B. (1884). La biologie cellulaire : étude comparée de la cellule dans les deux règnes, J. van In & cie.
- Carter, D. R., G. S. Beaupre, et al. (1998). "Mechanobiology of skeletal regeneration." Clin Orthop Relat Res(355 Suppl): S41-55.
- Castellano, G., G. Malaponte, et al. (2008). "Activation of the osteopontin/matrix metalloproteinase-9 pathway correlates with prostate cancer progression." Clin Cancer Res **14**(22): 7470-80.
- Castronovo, V. and A. Bellahcene (1998). "Evidence that breast cancer associated microcalcifications are mineralized malignant cells." Int J Oncol **12**(2): 305-8.
- Catros, S., N. Zwetyenga, et al. (2009). "Subcutaneous-induced membranes have no osteoinductive effect on macroporous HA-TCP in vivo." J Orthop Res **27**(2): 155-61.
- Chakraborty, M., D. Chatterjee, et al. (1994). "Cell cycle-dependent and kinase-specific regulation of the apical Na/H exchanger and the Na,K-ATPase in the kidney cell line LLC-PK1 by calcitonin." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(6): 2115-9.
- Chappard, D. (1989). Sauramps Medical.
- Charnley, J. and S. L. Baker (1952). "Compression arthrodesis of the knee; a clinical and histological study." J Bone Joint Surg Br **34-B**(2): 187-99.
- Chellaiah, M. A. and K. A. Hruska (2003). "The integrin alpha(v)beta(3) and CD44 regulate the actions of osteopontin on osteoclast motility." Calcif Tissue Int **72**(3): 197-205.
- Chellaiah, M. A., N. Kizer, et al. (2003). "Osteopontin deficiency produces osteoclast dysfunction due to reduced CD44 surface expression." Mol Biol Cell **14**(1): 173-89.
- Chen, T. L., L. Aronow, et al. (1977). "Glucocorticoid receptors and inhibition of bone cell growth in primary culture." Endocrinology **100**(3): 619-28.

- Chen, W. J., S. Jingushi, et al. (2004). "Effects of FGF-2 on metaphyseal fracture repair in rabbit tibiae." J Bone Miner Metab **22**(4): 303-9.
- Chen, Y. J., Y. Y. Wei, et al. (2009). "Osteopontin increases migration and MMP-9 up-regulation via alphavbeta3 integrin, FAK, ERK, and NF-kappaB-dependent pathway in human chondrosarcoma cells." J Cell Physiol **221**(1): 98-108.
- Cheng, H., W. Jiang, et al. (2003). "Osteogenic activity of the fourteen types of human bone morphogenetic proteins (BMPs)." J Bone Joint Surg Am **85-A**(8): 1544-52.
- Choi, I. H., C. Y. Chung, et al. (2002). "Angiogenesis and mineralization during distraction osteogenesis." J Korean Med Sci **17**(4): 435-47.
- Chow, J. W., A. J. Wilson, et al. (1998). "Mechanical loading stimulates bone formation by reactivation of bone lining cells in 13-week-old rats." J Bone Miner Res **13**(11): 1760-7.
- Civitelli, R. (2008). "Cell-cell communication in the osteoblast/osteocyte lineage." Arch Biochem Biophys **473**(2): 188-92.
- Claes, L. E. and C. A. Heigele (1999). "Magnitudes of local stress and strain along bony surfaces predict the course and type of fracture healing." J Biomech **32**(3): 255-66.
- Colnot, C. (2008). "Skeletal Cell Fate Decisions Within Periosteum and Bone Marrow During Bone Regeneration." J Bone Miner Res.
- Colnot, C. (2009). "Skeletal cell fate decisions within periosteum and bone marrow during bone regeneration." J Bone Miner Res **24**(2): 274-82.
- Colnot, C., S. Huang, et al. (2006). "Analyzing the cellular contribution of bone marrow to fracture healing using bone marrow transplantation in mice." Biochem Biophys Res Commun **350**(3): 557-61.
- Colnot, C., Z. Thompson, et al. (2003). "Altered fracture repair in the absence of MMP9." Development **130**(17): 4123-33.
- Contractor, T., B. Babiarz, et al. (2005). "Osteoclasts resorb protein-free mineral (Osteologic discs) efficiently in the absence of osteopontin." In Vivo **19**(2): 335-41.
- Couly, G. F., P. M. Coltey, et al. (1993). "The triple origin of skull in higher vertebrates: a study in quail-chick chimeras." Development **117**(2): 409-29.
- Cowan, C. M., Y. Y. Shi, et al. (2004). "Adipose-derived adult stromal cells heal critical-size mouse calvarial defects." Nat Biotechnol **22**(5): 560-7.
- Cui, Q., Z. Xiao, et al. (2006). "Use of genetically engineered bone-marrow stem cells to treat femoral defects: an experimental study." J Bone Joint Surg Am **88 Suppl 3**: 167-72.
- Cullinane, D. M., A. Fredrick, et al. (2002). "Induction of a neoarthrosis by precisely controlled motion in an experimental mid-femoral defect." J Orthop Res **20**(3): 579-86.
- Cullinane, D. M., K. T. Salisbury, et al. (2003). "Effects of the local mechanical environment on vertebrate tissue differentiation during repair: does repair recapitulate development?" J Exp Biol **206**(Pt 14): 2459-71.
- Dacquin, R., R. A. Davey, et al. (2004). "Amylin inhibits bone resorption while the calcitonin receptor controls bone formation in vivo." J Cell Biol **164**(4): 509-14.
- David, V., A. Martin, et al. (2009). "MEPE is a new bone renal hormone & vascularization modulator." Endocrinology.
- Davis, L. A. and N. I. Zur Nieden (2008). "Mesodermal fate decisions of a stem cell: the Wnt switch." Cell Mol Life Sci **65**(17): 2658-74.
- Day, T. F., X. Guo, et al. (2005). "Wnt/beta-catenin signaling in mesenchymal progenitors controls osteoblast and chondrocyte differentiation during vertebrate skeletogenesis." Dev Cell **8**(5): 739-50.
- Day, T. F. and Y. Yang (2008). "Wnt and hedgehog signaling pathways in bone development." J Bone Joint Surg Am **90 Suppl 1**: 19-24.

- Deckers, M. M., R. L. van Bezooijen, et al. (2002). "Bone morphogenetic proteins stimulate angiogenesis through osteoblast-derived vascular endothelial growth factor A." Endocrinology **143**(4): 1545-53.
- Degano, I. R., M. Vilalta, et al. (2008). "Bioluminescence imaging of calvarial bone repair using bone marrow and adipose tissue-derived mesenchymal stem cells." Biomaterials **29**(4): 427-37.
- Delaisse, J. M., T. L. Andersen, et al. (2003). "Matrix metalloproteinases (MMP) and cathepsin K contribute differently to osteoclastic activities." Microsc Res Tech **61**(6): 504-13.
- Dempster, D. W., C. E. Hughes-Begos, et al. (2005). "Normal human osteoclasts formed from peripheral blood monocytes express PTH type 1 receptors and are stimulated by PTH in the absence of osteoblasts." J Cell Biochem **95**(1): 139-48.
- Denhardt, D. T., C. A. Lopez, et al. (1995). "Osteopontin-induced modifications of cellular functions." Ann N Y Acad Sci **760**: 127-42.
- Dimitriou, R., E. Tsiridis, et al. (2005). "Current concepts of molecular aspects of bone healing." Injury **36**(12): 1392-404.
- Dobnig, H. and R. T. Turner (1995). "Evidence that intermittent treatment with parathyroid hormone increases bone formation in adult rats by activation of bone lining cells." Endocrinology **136**(8): 3632-8.
- Doherty, M. J., B. A. Ashton, et al. (1998). "Vascular pericytes express osteogenic potential in vitro and in vivo." J Bone Miner Res **13**(5): 828-38.
- Donahue, S. W. and S. A. Galley (2006). "Microdamage in bone: implications for fracture, repair, remodeling, and adaptation." Crit Rev Biomed Eng **34**(3): 215-71.
- Doyle, M. E. and S. M. Jan de Beur (2008). "The skeleton: endocrine regulator of phosphate homeostasis." Curr Osteoporos Rep **6**(4): 134-41.
- Ducy, P., C. Desbois, et al. (1996). "Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice." Nature **382**(6590): 448-52.
- Duvall, C. L., W. R. Taylor, et al. (2007). "Impaired angiogenesis, early callus formation, and late stage remodeling in fracture healing of osteopontin-deficient mice." J Bone Miner Res **22**(2): 286-97.
- Dziewiatkowski, D. D. and L. L. Majznerski (1985). "Role of proteoglycans in endochondral ossification: inhibition of calcification." Calcif Tissue Int **37**(5): 560-4.
- Einhorn, T. A. (1998). "The cell and molecular biology of fracture healing." Clin Orthop Relat Res(355 Suppl): S7-21.
- Erikson, D. W., R. C. Burghardt, et al. (2009). "Secreted Phosphoprotein 1 (SPP1, Osteopontin) Binds to Integrin Alphavbeta6 on Porcine Trophectoderm Cells and Integrin Alphavbeta3 on Uterine Luminal Epithelial Cells, and Promotes Trophectoderm Cell Adhesion and Migration." Biol Reprod.
- Everts, V., J. M. Delaisse, et al. (2002). "The bone lining cell: its role in cleaning Howship's lacunae and initiating bone formation." J Bone Miner Res **17**(1): 77-90.
- Favus, M. J., D. A. Bushinsky, et al. (2006). Regulation of Calcium, Magnesium, and Phosphate Metabolism. Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism ASBMR. Washington D.C., Daniel D. Bikle, American Society for Bone Mineral Research, 76-83.
- Fedarko, N. S., B. Fohr, et al. (2000). "Factor H binding to bone sialoprotein and osteopontin enables tumor cell evasion of complement-mediated attack." J Biol Chem **275**(22): 16666-72.
- Fedarko, N. S., A. Jain, et al. (2004). "Three small integrin binding ligand N-linked glycoproteins (SIBLINGs) bind and activate specific matrix metalloproteinases." Faseb J **18**(6): 734-6.

- Feeley, B. T., A. H. Conduah, et al. (2006). "In vivo molecular imaging of adenoviral versus lentiviral gene therapy in two bone formation models." *J Orthop Res* **24**(8): 1709-21.
- Ferguson, C., E. Alpern, et al. (1999). "Does adult fracture repair recapitulate embryonic skeletal formation?" *Mech Dev* **87**(1-2): 57-66.
- Fiedler, J., G. Roderer, et al. (2002). "BMP-2, BMP-4, and PDGF-bb stimulate chemotactic migration of primary human mesenchymal progenitor cells." *J Cell Biochem* **87**(3): 305-12.
- Findikcioglu, K., F. Findikcioglu, et al. (2009). "Effect of platelet-rich plasma and fibrin glue on healing of critical-size calvarial bone defects." *J Craniofac Surg* **20**(1): 34-40.
- Fisher, L. W. and N. S. Fedarko (2003). "Six genes expressed in bones and teeth encode the current members of the SIBLING family of proteins." *Connect Tissue Res* **44 Suppl 1**: 33-40.
- Fisher, L. W., O. W. McBride, et al. (1990). "Human bone sialoprotein. Deduced protein sequence and chromosomal localization." *J Biol Chem* **265**(4): 2347-51.
- Fisher, L. W., D. A. Torchia, et al. (2001). "Flexible structures of SIBLING proteins, bone sialoprotein, and osteopontin." *Biochem Biophys Res Commun* **280**(2): 460-5.
- Fisher, L. W., S. W. Whitson, et al. (1983). "Matrix sialoprotein of developing bone." *J Biol Chem* **258**(20): 12723-7.
- Fleischmajer, R., J. S. Perlish, et al. (1987). "Amino and carboxyl propeptides in bone collagen fibrils during embryogenesis." *Cell Tissue Res* **247**(1): 105-9.
- Fong, Y. C., S. C. Liu, et al. (2009). "Osteopontin increases lung cancer cells migration via activation of the alphavbeta3 integrin/FAK/Akt and NF-kappaB-dependent pathway." *Lung Cancer* **64**(3): 263-70.
- Fricain, J. C., P. L. Granja, et al. (2002). "Cellulose phosphates as biomaterials. In vivo biocompatibility studies." *Biomaterials* **23**(4): 971-80.
- Friedman, P. A. and F. A. Gesek (1995). "Cellular calcium transport in renal epithelia: measurement, mechanisms, and regulation." *Physiol Rev* **75**(3): 429-71.
- Fujisawa, R., M. Mizuno, et al. (1997). "Attachment of osteoblastic cells to hydroxyapatite crystals by a synthetic peptide (Glu7-Pro-Arg-Gly-Asp-Thr) containing two functional sequences of bone sialoprotein." *Matrix Biol* **16**(1): 21-8.
- Fujita, M., T. Urano, et al. (2002). "Estrogen activates cyclin-dependent kinases 4 and 6 through induction of cyclin D in rat primary osteoblasts." *Biochem Biophys Res Commun* **299**(2): 222-8.
- Furger, K. A., A. L. Allan, et al. (2003). "Beta(3) integrin expression increases breast carcinoma cell responsiveness to the malignancy-enhancing effects of osteopontin." *Mol Cancer Res* **1**(11): 810-9.
- Ganss, B., R. H. Kim, et al. (1999). "Bone sialoprotein." *Crit Rev Oral Biol Med* **10**(1): 79-98.
- Garimella, R., X. Bi, et al. (2006). "Nature of phosphate substrate as a major determinant of mineral type formed in matrix vesicle-mediated in vitro mineralization: An FTIR imaging study." *Bone* **38**(6): 811-7.
- Gerber, H. P., T. H. Vu, et al. (1999). "VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation." *Nat Med* **5**(6): 623-8.
- Gerstenfeld, L. C., T. J. Cho, et al. (2001). "Impaired intramembranous bone formation during bone repair in the absence of tumor necrosis factor-alpha signaling." *Cells Tissues Organs* **169**(3): 285-94.
- Gerstenfeld, L. C., T. J. Cho, et al. (2003). "Impaired fracture healing in the absence of TNF-alpha signaling: the role of TNF-alpha in endochondral cartilage resorption." *J Bone Miner Res* **18**(9): 1584-92.

- Gerstenfeld, L. C., D. M. Cullinane, et al. (2003). "Fracture healing as a post-natal developmental process: molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation." J Cell Biochem **88**(5): 873-84.
- Giachelli, C. M., M. Y. Speer, et al. (2005). "Regulation of vascular calcification: roles of phosphate and osteopontin." Circ Res **96**(7): 717-22.
- Giannoudis, P. V., T. A. Einhorn, et al. (2007). "Fracture healing: the diamond concept." Injury **38 Suppl 4**: S3-6.
- Glimcher, M. J. (1989). "Mechanism of calcification: role of collagen fibrils and collagen-phosphoprotein complexes in vitro and in vivo." Anat Rec **224**(2): 139-53.
- Gohel, A., M. B. McCarthy, et al. (1999). "Estrogen prevents glucocorticoid-induced apoptosis in osteoblasts in vivo and in vitro." Endocrinology **140**(11): 5339-47.
- Goldberg, H. A., K. J. Warner, et al. (1996). "Determination of the hydroxyapatite-nucleating region of bone sialoprotein." Connect Tissue Res **35**(1-4): 385-92.
- Gordon, J. A., G. K. Hunter, et al. (2009). "Activation of the mitogen-activated protein kinase pathway by bone sialoprotein regulates osteoblast differentiation." Cells Tissues Organs **189**(1-4): 138-43.
- Gordon, J. A., J. Sodek, et al. (2009). "Bone sialoprotein stimulates focal adhesion-related signaling pathways: Role in migration and survival of breast and prostate cancer cells." J Cell Biochem.
- Gordon, J. A., C. E. Tye, et al. (2007). "Bone sialoprotein expression enhances osteoblast differentiation and matrix mineralization in vitro." Bone **41**(3): 462-73.
- Gorski, J. P. (1998). "Is all bone the same? Distinctive distributions and properties of non-collagenous matrix proteins in lamellar vs. woven bone imply the existence of different underlying osteogenic mechanisms." Crit Rev Oral Biol Med **9**(2): 201-23.
- Gorski, J. P., A. Wang, et al. (2004). "Extracellular bone acidic glycoprotein-75 defines condensed mesenchyme regions to be mineralized and localizes with bone sialoprotein during intramembranous bone formation." J Biol Chem **279**(24): 25455-63.
- Gowen, L. C., D. N. Petersen, et al. (2003). "Targeted disruption of the osteoblast/osteocyte factor 45 gene (OF45) results in increased bone formation and bone mass." J Biol Chem **278**(3): 1998-2007.
- Graf, K. and P. Stawowy (2004). "Osteopontin: a protective mediator of cardiac fibrosis?" Hypertension **44**(6): 809-10.
- Grellier, M. (2008). La communication ostéo-endothéliale : application en ingénierie du tissu osseux. Bordeaux, Université Victor Segalen Bordeaux 2. **Doctorat**.
- Grellier, M., P. L. Granja, et al. (2009). "The effect of the co-immobilization of human osteoprogenitors and endothelial cells within alginate microspheres on mineralization in a bone defect." Biomaterials **30**(19): 3271-8.
- Griffon, D. J., D. G. Dunlop, et al. (2001). "Early dissolution of a morsellised impacted silicate-free bioactive glass in metaphyseal defects." J Biomed Mater Res **58**(6): 638-44.
- Haapasalo, H., S. Kontulainen, et al. (2000). "Exercise-induced bone gain is due to enlargement in bone size without a change in volumetric bone density: a peripheral quantitative computed tomography study of the upper arms of male tennis players." Bone **27**(3): 351-7.
- Hakki, S. S., D. Wang, et al. (2006). "Bone sialoprotein gene transfer to periodontal ligament cells may not be sufficient to promote mineralization in vitro or in vivo." J Periodontol **77**(2): 167-73.
- Hall, B. K. and T. Miyake (1992). "The membranous skeleton: the role of cell condensations in vertebrate skeletogenesis." Anat Embryol (Berl) **186**(2): 107-24.

- Hammerle, C. H., J. Schmid, et al. (1995). "Temporal dynamics of healing in rabbit cranial defects using guided bone regeneration." J Oral Maxillofac Surg **53**(2): 167-74.
- Harmey, D., L. Hesse, et al. (2004). "Concerted regulation of inorganic pyrophosphate and osteopontin by *akp2*, *enpp1*, and *ank*: an integrated model of the pathogenesis of mineralization disorders." Am J Pathol **164**(4): 1199-209.
- Harmey, D., K. A. Johnson, et al. (2006). "Elevated skeletal osteopontin levels contribute to the hypophosphatasia phenotype in *Akp2*(-/-) mice." J Bone Miner Res **21**(9): 1377-86.
- Harry, L. E., A. Sandison, et al. (2008). "Comparison of the healing of open tibial fractures covered with either muscle or fasciocutaneous tissue in a murine model." J Orthop Res **26**(9): 1238-44.
- Hayashi, C., S. Rittling, et al. (2007). "Serum osteopontin, an enhancer of tumor metastasis to bone, promotes B16 melanoma cell migration." J Cell Biochem **101**(4): 979-86.
- Hazenbergh, J. G., T. A. Hentunen, et al. (2009). "Microdamage detection and repair in bone: fracture mechanics, histology, cell biology." Technol Health Care **17**(1): 67-75.
- He, Y., Z. Y. Zhang, et al. (2007). "Experimental study on reconstruction of segmental mandible defects using tissue engineered bone combined bone marrow stromal cells with three-dimensional tricalcium phosphate." J Craniofac Surg **18**(4): 800-5.
- Heino, T. J., K. Kurata, et al. (2009). "Evidence for the role of osteocytes in the initiation of targeted remodeling." Technol Health Care **17**(1): 49-56.
- Henderson, J. H. and D. R. Carter (2002). "Mechanical induction in limb morphogenesis: the role of growth-generated strains and pressures." Bone **31**(6): 645-53.
- Hiltunen, A., H. T. Aro, et al. (1993). "Regulation of extracellular matrix genes during fracture healing in mice." Clin Orthop Relat Res(297): 23-7.
- Hiltunen, A., E. Vuorio, et al. (1993). "A standardized experimental fracture in the mouse tibia." J Orthop Res **11**(2): 305-12.
- Hing, K. A. (2004). "Bone repair in the twenty-first century: biology, chemistry or engineering?" Philos Transact A Math Phys Eng Sci **362**(1825): 2821-50.
- Hoff, A. O., P. Catala-Lehnen, et al. (2002). "Increased bone mass is an unexpected phenotype associated with deletion of the calcitonin gene." J Clin Invest **110**(12): 1849-57.
- Hollinger, J. O. and J. C. Kleinschmidt (1990). "The critical size defect as an experimental model to test bone repair materials." J Craniofac Surg **1**(1): 60-8.
- Horwitz, M. J., M. B. Tedesco, et al. (2005). "Continuous PTH and PTHrP infusion causes suppression of bone formation and discordant effects on 1,25(OH)<sub>2</sub> vitamin D." J Bone Miner Res **20**(10): 1792-803.
- Hsia, H. C. and J. E. Schwarzbauer (2005). "Meet the tenascins: multifunctional and mysterious." J Biol Chem **280**(29): 26641-4.
- Huang, W., B. Carlsen, et al. (2004). "Osteopontin is a negative regulator of proliferation and differentiation in MC3T3-E1 pre-osteoblastic cells." Bone **34**(5): 799-808.
- Hughes, F. J., J. Collyer, et al. (1995). "The effects of bone morphogenetic protein-2, -4, and -6 on differentiation of rat osteoblast cells in vitro." Endocrinology **136**(6): 2671-7.
- Hunter, G. K. and H. A. Goldberg (1993). "Nucleation of hydroxyapatite by bone sialoprotein." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(18): 8562-5.
- Hunter, G. K., P. V. Hauschka, et al. (1996). "Nucleation and inhibition of hydroxyapatite formation by mineralized tissue proteins." Biochem J **317** ( Pt 1): 59-64.
- Hunter, G. K., C. L. Kyle, et al. (1994). "Modulation of crystal formation by bone phosphoproteins: structural specificity of the osteopontin-mediated inhibition of hydroxyapatite formation." Biochem J **300** ( Pt 3): 723-8.

- Huq, N. L., K. J. Cross, et al. (2005). "A review of protein structure and gene organisation for proteins associated with mineralised tissue and calcium phosphate stabilisation encoded on human chromosome 4." *Arch Oral Biol* **50**(7): 599-609.
- Hutmacher, D. W. and M. Sitterling (2003). "Periosteal cells in bone tissue engineering." *Tissue Eng* **9 Suppl 1**: S45-64.
- Hwang, Q., S. Cheifetz, et al. (2009). "Bone sialoprotein does not interact with pro-gelatinase A (MMP-2) or mediate MMP-2 activation." *BMC Cancer* **9**: 121.
- Ibrahim, T., I. Leong, et al. (2000). "Expression of bone sialoprotein and osteopontin in breast cancer bone metastases." *Clin Exp Metastasis* **18**(3): 253-60.
- Ihara, H., D. T. Denhardt, et al. (2001). "Parathyroid hormone-induced bone resorption does not occur in the absence of osteopontin." *J Biol Chem* **276**(16): 13065-71.
- Inzerillo, A. M., M. Zaidi, et al. (2002). "Calcitonin: the other thyroid hormone." *Thyroid* **12**(9): 791-8.
- Isaksson, H., W. Wilson, et al. (2006). "Comparison of biophysical stimuli for mechano-regulation of tissue differentiation during fracture healing." *J Biomech* **39**(8): 1507-16.
- Ishijima, M., Y. Ezura, et al. (2006). "Osteopontin is associated with nuclear factor kappaB gene expression during tail-suspension-induced bone loss." *Exp Cell Res* **312**(16): 3075-83.
- Iwasaki, M., A. X. Le, et al. (1997). "Expression of indian hedgehog, bone morphogenetic protein 6 and gli during skeletal morphogenesis." *Mech Dev* **69**(1-2): 197-202.
- Iwata, T., L. Chen, et al. (2000). "A neonatal lethal mutation in FGFR3 uncouples proliferation and differentiation of growth plate chondrocytes in embryos." *Hum Mol Genet* **9**(11): 1603-13.
- Jacob, A. L., C. Smith, et al. (2006). "Fibroblast growth factor receptor 1 signaling in the osteo-chondrogenic cell lineage regulates sequential steps of osteoblast maturation." *Dev Biol* **296**(2): 315-28.
- Jiang, J. X., A. J. Siller-Jackson, et al. (2007). "Roles of gap junctions and hemichannels in bone cell functions and in signal transmission of mechanical stress." *Front Biosci* **12**: 1450-62.
- Jilka, R. L., G. Hangoc, et al. (1992). "Increased osteoclast development after estrogen loss: mediation by interleukin-6." *Science* **257**(5066): 88-91.
- Jingushi, S., M. E. Joyce, et al. (1992). "Genetic expression of extracellular matrix proteins correlates with histologic changes during fracture repair." *J Bone Miner Res* **7**(9): 1045-55.
- Jono, S., C. Peinado, et al. (2000). "Phosphorylation of osteopontin is required for inhibition of vascular smooth muscle cell calcification." *J Biol Chem* **275**(26): 20197-203.
- Kaigler, D., P. H. Krebsbach, et al. (2005). "Endothelial cell modulation of bone marrow stromal cell osteogenic potential." *Faseb J* **19**(6): 665-7.
- Kamakura, S., Y. Sasano, et al. (1999). "Implantation of octacalcium phosphate (OCP) in rat skull defects enhances bone repair." *J Dent Res* **78**(11): 1682-7.
- Kanczler, J. M. and R. O. Oreffo (2008). "Osteogenesis and angiogenesis: the potential for engineering bone." *Eur Cell Mater* **15**: 100-14.
- Karadag, A. and L. W. Fisher (2006). "Bone sialoprotein enhances migration of bone marrow stromal cells through matrices by bridging MMP-2 to alpha(v)beta3-integrin." *J Bone Miner Res* **21**(10): 1627-36.
- Karsdal, M. A., K. Henriksen, et al. (2005). "Acidification of the osteoclastic resorption compartment provides insight into the coupling of bone formation to bone resorption." *Am J Pathol* **166**(2): 467-76.
- Kato, S. (2009). "[Hormones and osteoporosis update. Estrogen and bone remodeling]." *Clin Calcium* **19**(7): 951-6.

- Kawasaki, K., T. Suzuki, et al. (2004). "Genetic basis for the evolution of vertebrate mineralized tissue." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(31): 11356-61.
- Kawasaki, K. and K. M. Weiss (2006). "Evolutionary genetics of vertebrate tissue mineralization: the origin and evolution of the secretory calcium-binding phosphoprotein family." J Exp Zool B Mol Dev Evol **306**(3): 295-316.
- Kawasaki, K. and K. M. Weiss (2008). "SCPP gene evolution and the dental mineralization continuum." J Dent Res **87**(6): 520-31.
- Kirsch, T. (2005). "Annexins - their role in cartilage mineralization." Front Biosci **10**: 576-81.
- Kirsch, T. and R. E. Wuthier (1994). "Stimulation of calcification of growth plate cartilage matrix vesicles by binding to type II and X collagens." J Biol Chem **269**(15): 11462-9.
- Kitahara, K., M. Ishijima, et al. (2003). "Osteopontin deficiency induces parathyroid hormone enhancement of cortical bone formation." Endocrinology **144**(5): 2132-40.
- Knothe Tate, M. L., J. R. Adamson, et al. (2004). "The osteocyte." Int J Biochem Cell Biol **36**(1): 1-8.
- Kojima, H., T. Uede, et al. (2004). "In vitro and in vivo effects of the overexpression of osteopontin on osteoblast differentiation using a recombinant adenoviral vector." J Biochem **136**(3): 377-86.
- Kon, T., T. J. Cho, et al. (2001). "Expression of osteoprotegerin, receptor activator of NF-kappaB ligand (osteoprotegerin ligand) and related proinflammatory cytokines during fracture healing." J Bone Miner Res **16**(6): 1004-14.
- Koyama, Y., S. R. Rittling, et al. (2006). "Osteopontin deficiency suppresses high phosphate load-induced bone loss via specific modulation of osteoclasts." Endocrinology **147**(6): 3040-9.
- Kretlow, J. D., Y. Q. Jin, et al. (2008). "Donor age and cell passage affects differentiation potential of murine bone marrow-derived stem cells." BMC Cell Biol **9**: 60.
- Lacroix, D. and P. J. Prendergast (2002). "A mechano-regulation model for tissue differentiation during fracture healing: analysis of gap size and loading." J Biomech **35**(9): 1163-71.
- Lamagna, C. and G. Bergers (2006). "The bone marrow constitutes a reservoir of pericyte progenitors." J Leukoc Biol **80**(4): 677-81.
- Lamoureux, F., M. Baud'huin, et al. (2007). "Proteoglycans: key partners in bone cell biology." Bioessays **29**(8): 758-71.
- Laroche, M. (2002). "Intraosseous circulation from physiology to disease." Joint Bone Spine **69**(3): 262-9.
- Leach, J. K., D. Kaigler, et al. (2006). "Coating of VEGF-releasing scaffolds with bioactive glass for angiogenesis and bone regeneration." Biomaterials **27**(17): 3249-55.
- Lehmann, W., C. M. Edgar, et al. (2005). "Tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) coordinately regulates the expression of specific matrix metalloproteinases (MMPS) and angiogenic factors during fracture healing." Bone **36**(2): 300-10.
- Li, Y. C., A. E. Pirro, et al. (1997). "Targeted ablation of the vitamin D receptor: an animal model of vitamin D-dependent rickets type II with alopecia." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(18): 9831-5.
- Liaw, L., D. E. Birk, et al. (1998). "Altered wound healing in mice lacking a functional osteopontin gene (spp1)." J Clin Invest **101**(7): 1468-78.
- Liaw, L., V. Lindner, et al. (1995). "Osteopontin and beta 3 integrin are coordinately expressed in regenerating endothelium in vivo and stimulate Arg-Gly-Asp-dependent endothelial migration in vitro." Circ Res **77**(4): 665-72.
- Lieberman, J. R., A. Daluiski, et al. (2002). "The role of growth factors in the repair of bone. Biology and clinical applications." J Bone Joint Surg Am **84-A**(6): 1032-44.

- Lindsey, W. H., D. A. Franz, et al. (1998). "A nasal critical-size defect: an experimental model for the evaluation of facial osseous repair techniques." Arch Otolaryngol Head Neck Surg **124**(8): 912-5.
- Little, D. G., M. Ramachandran, et al. (2007). "The anabolic and catabolic responses in bone repair." J Bone Joint Surg Br **89**(4): 425-33.
- Liu, S., J. Zhou, et al. (2008). "Pathogenic role of Fgf23 in Dmp1-null mice." Am J Physiol Endocrinol Metab **295**(2): E254-61.
- Liu, Y. J., D. Q. Zhang, et al. (2009). "Overexpression of human osteopontin increases cell proliferation and migration in human embryo kidney-293 cells." Cell Mol Biol Lett.
- Lorena, D., I. A. Darby, et al. (2006). "Osteopontin expression in normal and fibrotic liver: altered liver healing in osteopontin-deficient mice." J Hepatol **44**(2): 383-90.
- Luedtke, C. C., M. D. McKee, et al. (2002). "Osteopontin expression and regulation in the testis, efferent ducts, and epididymis of rats during postnatal development through to adulthood." Biol Reprod **66**(5): 1437-48.
- Luo, G., R. D'Souza, et al. (1995). "The matrix Gla protein gene is a marker of the chondrogenesis cell lineage during mouse development." J Bone Miner Res **10**(2): 325-34.
- Luo, G., P. Ducy, et al. (1997). "Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein." Nature **386**(6620): 78-81.
- MacDougall, M., D. Simmons, et al. (2002). "MEPE/OF45, a new dentin/bone matrix protein and candidate gene for dentin diseases mapping to chromosome 4q21." Connect Tissue Res **43**(2-3): 320-30.
- MacDougall, M., D. Simmons, et al. (1997). "Dentin phosphoprotein and dentin sialoprotein are cleavage products expressed from a single transcript coded by a gene on human chromosome 4. Dentin phosphoprotein DNA sequence determination." J Biol Chem **272**(2): 835-42.
- Machwate, M., E. Zerath, et al. (1994). "Insulin-like growth factor-I increases trabecular bone formation and osteoblastic cell proliferation in unloaded rats." Endocrinology **134**(3): 1031-8.
- Malaval, L. (2009). Matrice osseuse. Traité des Maladies métaboliques osseuses de l'adulte. M.-S. Flammarion. Paris, De Vernejoul, M-C., Marie, P.: 30-42.
- Malaval, L., J. E. Aubin, et al. (2009). "Role of the small integrin-binding ligand N-linked glycoprotein (SIBLING), bone sialoprotein (BSP) in bone development and remodeling." Osteoporos Int **20**(6): 1077-80.
- Malaval, L., L. Monfoulet, et al. (2009). "Absence of bone sialoprotein (BSP) impairs cortical defect repair in mouse long bone." Bone.
- Malaval, L., N. M. Wade-Gueye, et al. (2008). "Bone sialoprotein plays a functional role in bone formation and osteoclastogenesis." J Exp Med **205**(5): 1145-53.
- Malone, A. M., C. T. Anderson, et al. (2007). "Primary cilia in bone." J Musculoskelet Neuronal Interact **7**(4): 301.
- Malone, A. M., C. T. Anderson, et al. (2007). "Primary cilia mediate mechanosensing in bone cells by a calcium-independent mechanism." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(33): 13325-30.
- Marie, P. (2000). "[Bone morphogenic proteins (BMPs) and bone repair]." Rev Chir Orthop Reparatrice Appar Mot **86 Suppl 1**: 151-2.
- Marie, P. and P. Halbout (2008). "[OPG/RANKL: role and therapeutic target in osteoporosis]." Med Sci (Paris) **24**(1): 105-10.
- Martin, A., V. David, et al. (2008). "Degradation of MEPE, DMP1, and release of SIBLING ASARM-peptides (minhibins): ASARM-peptide(s) are directly responsible for defective mineralization in HYP." Endocrinology **149**(4): 1757-72.

- Martin, T. J. and N. A. Sims (2005). "Osteoclast-derived activity in the coupling of bone formation to resorption." Trends Mol Med **11**(2): 76-81.
- Matsui, Y., N. Iwasaki, et al. (2009). "Accelerated development of aging-associated and instability-induced osteoarthritis in osteopontin-deficient mice." Arthritis Rheum **60**(8): 2362-2371.
- Matsuo, K. and N. Irie (2008). "Osteoclast-osteoblast communication." Arch Biochem Biophys **473**(2): 201-9.
- Matusan-Ilijas, K., S. Behrem, et al. (2008). "Osteopontin expression correlates with angiogenesis and survival in malignant astrocytoma." Pathol Oncol Res **14**(3): 293-8.
- McKibbin, B. (1978). "The biology of fracture healing in long bones." J Bone Joint Surg Br **60-B**(2): 150-62.
- Midura, R. J., A. Vasanji, et al. (2007). "Calcospherulites isolated from the mineralization front of bone induce the mineralization of type I collagen." Bone **41**(6): 1005-16.
- Midura, R. J., A. Wang, et al. (2004). "Bone acidic glycoprotein-75 delineates the extracellular sites of future bone sialoprotein accumulation and apatite nucleation in osteoblastic cultures." J Biol Chem **279**(24): 25464-73.
- Mirams, M., B. G. Robinson, et al. (2004). "Bone as a source of FGF23: regulation by phosphate?" Bone **35**(5): 1192-9.
- Miyazaki, K., Y. Okada, et al. (2008). "Corneal wound healing in an osteopontin-deficient mouse." Invest Ophthalmol Vis Sci **49**(4): 1367-75.
- Mohan, S. and D. J. Baylink (1996). "Insulin-like growth factor system components and the coupling of bone formation to resorption." Horm Res **45 Suppl 1**: 59-62.
- Montesuit, C., J. P. Bonjour, et al. (1995). "Expression and regulation of Na-dependent P(i) transport in matrix vesicles produced by osteoblast-like cells." J Bone Miner Res **10**(4): 625-31.
- Moore, K. A. and I. R. Lemischka (2006). "Stem cells and their niches." Science **311**(5769): 1880-5.
- Morgan, E. F., R. E. Gleason, et al. (2008). "Mechanotransduction and fracture repair." J Bone Joint Surg Am **90 Suppl 1**: 25-30.
- Morgan, E. F., Z. D. Mason, et al. (2008). "Combined effects of recombinant human BMP-7 (rhBMP-7) and parathyroid hormone (1-34) in metaphyseal bone healing." Bone **43**(6): 1031-8.
- Mori, R., T. J. Shaw, et al. (2008). "Molecular mechanisms linking wound inflammation and fibrosis: knockdown of osteopontin leads to rapid repair and reduced scarring." J Exp Med **205**(1): 43-51.
- Most, W., L. Schot, et al. (1995). "In vitro and ex vivo evidence that estrogens suppress increased bone resorption induced by ovariectomy or PTH stimulation through an effect on osteoclastogenesis." J Bone Miner Res **10**(10): 1523-30.
- Mullender, M. G. and R. Huiskes (1997). "Osteocytes and bone lining cells: which are the best candidates for mechano-sensors in cancellous bone?" Bone **20**(6): 527-32.
- Mundy, G. R. and L. F. Bonewald (1990). "Role of TGF beta in bone remodeling." Ann N Y Acad Sci **593**: 91-7.
- Musgrave, D. S., R. Pruchnic, et al. (2002). "Human skeletal muscle cells in ex vivo gene therapy to deliver bone morphogenetic protein-2." J Bone Joint Surg Br **84**(1): 120-7.
- Musgrave, D. S., R. Pruchnic, et al. (2001). "The effect of bone morphogenetic protein-2 expression on the early fate of skeletal muscle-derived cells." Bone **28**(5): 499-506.
- Nagashima, M., A. Sakai, et al. (2005). "Bisphosphonate (YM529) delays the repair of cortical bone defect after drill-hole injury by reducing terminal differentiation of osteoblasts in the mouse femur." Bone **36**(3): 502-11.

- Nakamura, I., T. Duong le, et al. (2007). "Involvement of alpha(v)beta3 integrins in osteoclast function." J Bone Miner Metab **25**(6): 337-44.
- Nakamura, I., G. A. Rodan, et al. (2003). "Regulatory mechanism of osteoclast activation." J Electron Microsc (Tokyo) **52**(6): 527-33.
- Nakamura, T., Y. Imai, et al. (2007). "Estrogen prevents bone loss via estrogen receptor alpha and induction of Fas ligand in osteoclasts." Cell **130**(5): 811-23.
- Nanci, A., S. Zalzal, et al. (1996). "Ultrastructural characterization and immunolocalization of osteopontin in rat calvarial osteoblast primary cultures." Microsc Res Tech **33**(2): 214-31.
- Nash, T. J., C. R. Howlett, et al. (1994). "Effect of platelet-derived growth factor on tibial osteotomies in rabbits." Bone **15**(2): 203-8.
- Noble, B. S. (2008). "The osteocyte lineage." Arch Biochem Biophys **473**(2): 106-11.
- O'Regan, A. and J. S. Berman (2000). "Osteopontin: a key cytokine in cell-mediated and granulomatous inflammation." Int J Exp Pathol **81**(6): 373-90.
- Ogata, T., T. Ueyama, et al. (2007). "Osteopontin is a myosphere-derived secretory molecule that promotes angiogenic progenitor cell proliferation through the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway." Biochem Biophys Res Commun **359**(2): 341-7.
- Ogata, Y. (2008). "Bone sialoprotein and its transcriptional regulatory mechanism." J Periodontal Res **43**(2): 127-35.
- Okazaki, R., D. Inoue, et al. (2002). "Estrogen promotes early osteoblast differentiation and inhibits adipocyte differentiation in mouse bone marrow stromal cell lines that express estrogen receptor (ER) alpha or beta." Endocrinology **143**(6): 2349-56.
- Oldberg, A., A. Franzen, et al. (1986). "Cloning and sequence analysis of rat bone sialoprotein (osteopontin) cDNA reveals an Arg-Gly-Asp cell-binding sequence." Proc Natl Acad Sci U S A **83**(23): 8819-23.
- Olsen, B. R. (2006). Bone Embryology. Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism, ASBMR. Washington D.C., Daniel D. Bikle: 2-6.
- Olsen, B. R., A. M. Reginato, et al. (2000). "Bone development." Annu Rev Cell Dev Biol **16**: 191-220.
- Oni, O. O., H. Stafford, et al. (1992). "A study of diaphyseal fracture repair using tissue isolation techniques." Injury **23**(7): 467-70.
- Opolka, A., S. Ratzinger, et al. (2006). "Collagen IX is indispensable for timely maturation of cartilage during fracture repair in mice." Matrix Biol.
- Orcel, P. (2009). Ostéoporose cortisonique. Traité des Maladies métaboliques osseuses de l'adulte. M.-S. Flammarion. Paris, De Vernejoul, M-C.
- Marie, P.: 220-228.
- Ornitz, D. M. (2005). "FGF signaling in the developing endochondral skeleton." Cytokine Growth Factor Rev **16**(2): 205-13.
- Ornitz, D. M. and P. J. Marie (2002). "FGF signaling pathways in endochondral and intramembranous bone development and human genetic disease." Genes Dev **16**(12): 1446-65.
- Otto, F., A. P. Thornell, et al. (1997). "Cbfa1, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development." Cell **89**(5): 765-71.
- Owan, I., D. B. Burr, et al. (1997). "Mechanotransduction in bone: osteoblasts are more responsive to fluid forces than mechanical strain." Am J Physiol **273**(3 Pt 1): C810-5.
- Ozaki, A., M. Tsunoda, et al. (2000). "Role of fracture hematoma and periosteum during fracture healing in rats: interaction of fracture hematoma and the periosteum in the initial step of the healing process." J Orthop Sci **5**(1): 64-70.

- P.D. Delmas, L. M. (1989). Les protéines osseuses non collagéniques. Le tissu osseux. J. V. L. Teot, J. Dossa, Sauramps médical: 19-35.
- Pacicca, D. M., N. Patel, et al. (2003). "Expression of angiogenic factors during distraction osteogenesis." Bone **33**(6): 889-98.
- Page-McCaw, A., A. J. Ewald, et al. (2007). "Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(3): 221-33.
- Pallu, S., J. C. Fricain, et al. (2009). "Cyclo-DfKRG peptide modulates in vitro and in vivo behavior of human osteoprogenitor cells on titanium alloys." Acta Biomater.
- Pampena, D. A., K. A. Robertson, et al. (2004). "Inhibition of hydroxyapatite formation by osteopontin phosphopeptides." Biochem J **378**(Pt 3): 1083-7.
- Parfitt, A. M. (1987). "Bone and plasma calcium homeostasis." Bone **8 Suppl 1**: S1-8.
- Parfitt, A. M. (2000). "The mechanism of coupling: a role for the vasculature." Bone **26**(4): 319-23.
- Park, J. W., J. H. Jang, et al. (2009). "Bone formation with various bone graft substitutes in critical-sized rat calvarial defect." Clin Oral Implants Res **20**(4): 372-8.
- Park, S. H., K. O'Connor, et al. (1998). "The influence of active shear or compressive motion on fracture-healing." J Bone Joint Surg Am **80**(6): 868-78.
- Patarca, R., G. J. Freeman, et al. (1989). "Structural and functional studies of the early T lymphocyte activation 1 (Eta-1) gene. Definition of a novel T cell-dependent response associated with genetic resistance to bacterial infection." J Exp Med **170**(1): 145-61.
- Pauwels, F. (1976). "[Developmental effects of the functional adaptation of bone]." Anat Anz **139**(3): 213-20.
- Perren, S. M. (1979). "Physical and biological aspects of fracture healing with special reference to internal fixation." Clin Orthop Relat Res(138): 175-96.
- Persy, V. P., A. Verhulst, et al. (2003). "Reduced postischemic macrophage infiltration and interstitial fibrosis in osteopontin knockout mice." Kidney Int **63**(2): 543-53.
- Peters, C. L., J. L. Hines, et al. (2006). "Biological effects of calcium sulfate as a bone graft substitute in ovine metaphyseal defects." J Biomed Mater Res A **76**(3): 456-62.
- Phillips, A. M. (2005). "Overview of the fracture healing cascade." Injury **36 Suppl 3**: S5-7.
- Prendergast, P. J., R. Huiskes, et al. (1997). "ESB Research Award 1996. Biophysical stimuli on cells during tissue differentiation at implant interfaces." J Biomech **30**(6): 539-48.
- Pritchard, J. J. (1972). General histology of bone. The biochemistry and physiology of bone. G. H. Bourne, Academic Press: 1:19.
- Qin, C., O. Baba, et al. (2004). "Post-translational modifications of sibling proteins and their roles in osteogenesis and dentinogenesis." Crit Rev Oral Biol Med **15**(3): 126-36.
- Qin, C., R. D'Souza, et al. (2007). "Dentin matrix protein 1 (DMP1): new and important roles for biomineralization and phosphate homeostasis." J Dent Res **86**(12): 1134-41.
- Quarles, L. D. (2003). "Evidence for a bone-kidney axis regulating phosphate homeostasis." J Clin Invest **112**(5): 642-6.
- Quarles, L. D. (2003). "FGF23, PHEX, and MEPE regulation of phosphate homeostasis and skeletal mineralization." Am J Physiol Endocrinol Metab **285**(1): E1-9.
- Raheja, L. F., D. C. Genetos, et al. (2008). "Hypoxic osteocytes recruit human MSCs through an OPN/CD44-mediated pathway." Biochem Biophys Res Commun **366**(4): 1061-6.
- Rajantie, I., M. Ilmonen, et al. (2004). "Adult bone marrow-derived cells recruited during angiogenesis comprise precursors for periendothelial vascular mural cells." Blood **104**(7): 2084-6.
- Rangaswami, H., A. Bulbule, et al. (2006). "Osteopontin: role in cell signaling and cancer progression." Trends Cell Biol **16**(2): 79-87.
- Reichert, J. C., S. Saifzadeh, et al. (2009). "The challenge of establishing preclinical models for segmental bone defect research." Biomaterials **30**(12): 2149-63.

- Rhineland, F. W. (1972). Circulation of Bone. The biochemistry and physiology of Bone. G. H. Bourne. New York, London, Academic Press, Inc. **II**: 2-79.
- Richman, C., D. J. Baylink, et al. (1999). "Recombinant human insulin-like growth factor-binding protein-5 stimulates bone formation parameters in vitro and in vivo." Endocrinology **140**(10): 4699-705.
- Rittling, S. R., H. N. Matsumoto, et al. (1998). "Mice lacking osteopontin show normal development and bone structure but display altered osteoclast formation in vitro." J Bone Miner Res **13**(7): 1101-11.
- Robinson, B. P., J. O. Hollinger, et al. (1995). "Calvarial bone repair with porous D,L-poly lactide." Otolaryngol Head Neck Surg **112**(6): 707-13.
- Robling, A. G., A. B. Castillo, et al. (2006). "Biomechanical and molecular regulation of bone remodeling." Annu Rev Biomed Eng **8**: 455-98.
- Roodman, G. D. (1999). "Cell biology of the osteoclast." Exp Hematol **27**(8): 1229-41.
- Rouwkema, J. (2007). Prevascularized bone tissue engineering. Enschede, University of Twente.
- Rowe, P. S., P. A. de Zoysa, et al. (2000). "MEPE, a new gene expressed in bone marrow and tumors causing osteomalacia." Genomics **67**(1): 54-68.
- Rowe, P. S., I. R. Garrett, et al. (2005). "Surface plasmon resonance (SPR) confirms that MEPE binds to PHEX via the MEPE-ASARM motif: a model for impaired mineralization in X-linked rickets (HYP)." Bone **36**(1): 33-46.
- Rowe, P. S., Y. Kumagai, et al. (2004). "MEPE has the properties of an osteoblastic phosphatonin and minihibin." Bone **34**(2): 303-19.
- Rubin, J., C. Rubin, et al. (2006). "Molecular pathways mediating mechanical signaling in bone." Gene **367**: 1-16.
- Sam, F., Z. Xie, et al. (2004). "Mice lacking osteopontin exhibit increased left ventricular dilation and reduced fibrosis after aldosterone infusion." Am J Hypertens **17**(2): 188-93.
- Sandberg, M. M., H. T. Aro, et al. (1993). "Gene expression during bone repair." Clin Orthop Relat Res(289): 292-312.
- Sato, M., N. Yasui, et al. (1998). "Expression of bone matrix proteins mRNA during distraction osteogenesis." J Bone Miner Res **13**(8): 1221-31.
- Schell, H., D. R. Epari, et al. (2005). "The course of bone healing is influenced by the initial shear fixation stability." J Orthop Res **23**(5): 1022-8.
- Schindeler, A., R. Liu, et al. (2009). "The contribution of different cell lineages to bone repair: exploring a role for muscle stem cells." Differentiation **77**(1): 12-8.
- Schindeler, A., M. M. McDonald, et al. (2008). "Bone remodeling during fracture repair: The cellular picture." Semin Cell Dev Biol **19**(5): 459-66.
- Schlegel, K. A., F. J. Lang, et al. (2006). "The monocortical critical size bone defect as an alternative experimental model in testing bone substitute materials." Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod **102**(1): 7-13.
- Schmid, G. J., C. Kobayashi, et al. (2009). "Fibroblast growth factor expression during skeletal fracture healing in mice." Dev Dyn **238**(3): 766-74.
- Sekiya, I., K. Tsuji, et al. (2000). "SOX9 enhances aggrecan gene promoter/enhancer activity and is up-regulated by retinoic acid in a cartilage-derived cell line, TC6." J Biol Chem **275**(15): 10738-44.
- Senger, D. R., D. F. Wirth, et al. (1979). "Transformed mammalian cells secrete specific proteins and phosphoproteins." Cell **16**(4): 885-93.
- Shapiro, F. (1988). "Cortical bone repair. The relationship of the lacunar-canalicular system and intercellular gap junctions to the repair process." J Bone Joint Surg Am **70**(7): 1067-81.

- Shapiro, F. (2008). "Bone development and its relation to fracture repair. The role of mesenchymal osteoblasts and surface osteoblasts." Eur Cell Mater **15**: 53-76.
- Shi, S. and S. Gronthos (2003). "Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp." J Bone Miner Res **18**(4): 696-704.
- Shimada, T. (2009). "[Clinical aspect of recent progress in phosphate metabolism. FGF23 ; Physiological action and molecular mechanism in the regulation of phosphate and vitamin D metabolism.]." Clin Calcium **19**(6): 794-801.
- Shimada, T., H. Hasegawa, et al. (2004). "FGF-23 is a potent regulator of vitamin D metabolism and phosphate homeostasis." J Bone Miner Res **19**(3): 429-35.
- Shimada, T., M. Kakitani, et al. (2004). "Targeted ablation of Fgf23 demonstrates an essential physiological role of FGF23 in phosphate and vitamin D metabolism." J Clin Invest **113**(4): 561-8.
- Shimada, T., S. Mizutani, et al. (2001). "Cloning and characterization of FGF23 as a causative factor of tumor-induced osteomalacia." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(11): 6500-5.
- Shimada, T., Y. Yamazaki, et al. (2005). "Vitamin D receptor-independent FGF23 actions in regulating phosphate and vitamin D metabolism." Am J Physiol Renal Physiol **289**(5): F1088-95.
- Silve, C. (2009). PTH et PTH-rP. Traité des Maladies métaboliques osseuses de l'adulte. M.-S. Flammarion. Paris, De Vernejoul, M-CMarie, P: 84-88.
- Silver, I. A., R. J. Murrills, et al. (1988). "Microelectrode studies on the acid microenvironment beneath adherent macrophages and osteoclasts." Exp Cell Res **175**(2): 266-76.
- Sire, J. Y., S. Delgado, et al. (2005). "Amelogenin: lessons from evolution." Arch Oral Biol **50**(2): 205-12.
- Sitara, D., M. S. Razzaque, et al. (2004). "Homozygous ablation of fibroblast growth factor-23 results in hyperphosphatemia and impaired skeletogenesis, and reverses hypophosphatemia in PheX-deficient mice." Matrix Biol **23**(7): 421-32.
- Smit, T. H., E. H. Burger, et al. (2002). "A case for strain-induced fluid flow as a regulator of BMU-coupling and osteonal alignment." J Bone Miner Res **17**(11): 2021-9.
- Smith, L. L., H. K. Cheung, et al. (1996). "Osteopontin N-terminal domain contains a cryptic adhesive sequence recognized by alpha9beta1 integrin." J Biol Chem **271**(45): 28485-91.
- Sodek, J., B. Ganss, et al. (2000). "Osteopontin." Crit Rev Oral Biol Med **11**(3): 279-303.
- Solheim, E. (1998). "Growth factors in bone." Int Orthop **22**(6): 410-6.
- Speer, M. Y., Y. C. Chien, et al. (2005). "Smooth muscle cells deficient in osteopontin have enhanced susceptibility to calcification in vitro." Cardiovasc Res **66**(2): 324-33.
- Srivastava, S., G. Toraldo, et al. (2001). "Estrogen decreases osteoclast formation by down-regulating receptor activator of NF-kappa B ligand (RANKL)-induced JNK activation." J Biol Chem **276**(12): 8836-40.
- Street, J., M. Bao, et al. (2002). "Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(15): 9656-61.
- Stroncek, J. D. and W. M. Reichert (2007). Overview of wound healing in different tissue types. Indwelling neural implants - Strategies for contending with the in vivo environment. W. M. Reichert, CRC press, Taylor & Francis group: 3-40.
- Suda, T., N. Takahashi, et al. (1999). "Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families." Endocr Rev **20**(3): 345-57.
- Suda, T., Y. Ueno, et al. (2003). "Vitamin D and bone." J Cell Biochem **88**(2): 259-66.

- Suzuki, S., T. Sreenath, et al. (2009). "Dentin sialoprotein and dentin phosphoprotein have distinct roles in dentin mineralization." *Matrix Biol* **28**(4): 221-9.
- Takagi, K. and M. R. Urist (1982). "The role of bone marrow in bone morphogenetic protein-induced repair of femoral massive diaphyseal defects." *Clin Orthop Relat Res*(171): 224-31.
- Takahashi, N., T. Akatsu, et al. (1988). "Osteoblastic cells are involved in osteoclast formation." *Endocrinology* **123**(5): 2600-2.
- Takai, H., Y. Nakayama, et al. (2007). "Androgen receptor stimulates bone sialoprotein (BSP) gene transcription via cAMP response element and activator protein 1/glucocorticoid response elements." *J Cell Biochem* **102**(1): 240-51.
- Takeuchi, Y., Y. Kodama, et al. (1994). "Bone matrix decorin binds transforming growth factor-beta and enhances its bioactivity." *J Biol Chem* **269**(51): 32634-8.
- Tam, C. S., J. N. Heersche, et al. (1982). "Parathyroid hormone stimulates the bone apposition rate independently of its resorptive action: differential effects of intermittent and continuous administration." *Endocrinology* **110**(2): 506-12.
- Tanaka, H., A. Wakisaka, et al. (2003). "Effects of basic fibroblast growth factor on osteoblast-related gene expression in the process of medullary bone formation induced in rat femur." *J Bone Miner Metab* **21**(2): 74-9.
- Teitelbaum, S. L. (2000). "Bone resorption by osteoclasts." *Science* **289**(5484): 1504-8.
- Teramoto, H., M. D. Castellone, et al. (2005). "Autocrine activation of an osteopontin-CD44-Rac pathway enhances invasion and transformation by H-RasV12." *Oncogene* **24**(3): 489-501.
- Tfelt-Hansen, J. and E. M. Brown (2005). "The calcium-sensing receptor in normal physiology and pathophysiology: a review." *Crit Rev Clin Lab Sci* **42**(1): 35-70.
- Thompson, Z., T. Miclau, et al. (2002). "A model for intramembranous ossification during fracture healing." *J Orthop Res* **20**(5): 1091-8.
- Tomkinson, A., J. Reeve, et al. (1997). "The death of osteocytes via apoptosis accompanies estrogen withdrawal in human bone." *J Clin Endocrinol Metab* **82**(9): 3128-35.
- Tseng, S. S., M. A. Lee, et al. (2008). "Nonunions and the potential of stem cells in fracture-healing." *J Bone Joint Surg Am* **90 Suppl 1**: 92-8.
- Tsiridis, E., N. Upadhyay, et al. (2007). "Molecular aspects of fracture healing: which are the important molecules?" *Injury* **38 Suppl 1**: S11-25.
- Tsuchida, H., J. Hashimoto, et al. (2003). "Engineered allogeneic mesenchymal stem cells repair femoral segmental defect in rats." *J Orthop Res* **21**(1): 44-53.
- Turner, R. T., K. S. Hannon, et al. (1995). "Prednisone inhibits formation of cortical bone in sham-operated and ovariectomized female rats." *Calcif Tissue Int* **56**(4): 311-5.
- Tye, C. E., K. R. Rattray, et al. (2003). "Delineation of the hydroxyapatite-nucleating domains of bone sialoprotein." *J Biol Chem* **278**(10): 7949-55.
- Uchida, S., Y. Doi, et al. (2000). "Transient expression of activin betaA mRNA on osteoprogenitor cells in rat bone regeneration after drill-hole injury." *Bone* **27**(1): 81-90.
- Uthoff, H. K. and B. A. Rahn (1981). "Healing patterns of metaphyseal fractures." *Clin Orthop Relat Res*(160): 295-303.
- Uusitalo, H., J. Rantakokko, et al. (2001). "A metaphyseal defect model of the femur for studies of murine bone healing." *Bone* **28**(4): 423-9.
- Valdimarsdottir, G., M. J. Goumans, et al. (2002). "Stimulation of Id1 expression by bone morphogenetic protein is sufficient and necessary for bone morphogenetic protein-induced activation of endothelial cells." *Circulation* **106**(17): 2263-70.
- Valverde, P., J. Zhang, et al. (2008). "Overexpression of Bone Sialoprotein Leads to an Uncoupling of Bone Formation and Bone Resorption in Mice." *J Bone Miner Res.*

- Vanacker, J. M., C. Delmarre, et al. (1998). "Activation of the osteopontin promoter by the orphan nuclear receptor estrogen receptor related alpha." Cell Growth Differ **9**(12): 1007-14.
- Vedi, S. and J. E. Compston (1996). "The effects of long-term hormone replacement therapy on bone remodeling in postmenopausal women." Bone **19**(5): 535-9.
- Verdelis, K., Y. Ling, et al. (2008). "DSPP effects on in vivo bone mineralization." Bone **43**(6): 983-90.
- Vico, L., A. Perrier, et al. (2009). Activité physique et squelette. Traité des maladies métaboliques osseuses de l'adulte. M. S. Flammarion. Paris, De Vernejoul, M.-C., Marie, P.: 179-184.
- Virk, M. S., A. Conduah, et al. (2008). "Influence of short-term adenoviral vector and prolonged lentiviral vector mediated bone morphogenetic protein-2 expression on the quality of bone repair in a rat femoral defect model." Bone **42**(5): 921-31.
- Vortkamp, A., S. Pathi, et al. (1998). "Recapitulation of signals regulating embryonic bone formation during postnatal growth and in fracture repair." Mech Dev **71**(1-2): 65-76.
- Vu, T. H., J. M. Shipley, et al. (1998). "MMP-9/gelatinase B is a key regulator of growth plate angiogenesis and apoptosis of hypertrophic chondrocytes." Cell **93**(3): 411-22.
- Walsh, W. R., F. Vizesi, et al. (2008). "Beta-TCP bone graft substitutes in a bilateral rabbit tibial defect model." Biomaterials **29**(3): 266-71.
- Waltregny, D., A. Bellahcene, et al. (1998). "Prognostic value of bone sialoprotein expression in clinically localized human prostate cancer." J Natl Cancer Inst **90**(13): 1000-8.
- Wang, J., H. Y. Zhou, et al. (2006). "Site-specific in vivo calcification and osteogenesis stimulated by bone sialoprotein." Calcif Tissue Int **79**(3): 179-89.
- Weber, G. F., S. Ashkar, et al. (1996). "Receptor-ligand interaction between CD44 and osteopontin (Eta-1)." Science **271**(5248): 509-12.
- Whitfield, J. F. (2008). "The solitary (primary) cilium--a mechanosensory toggle switch in bone and cartilage cells." Cell Signal **20**(6): 1019-24.
- Wildemann, B., G. Schmidmaier, et al. (2004). "Quantification, localization, and expression of IGF-I and TGF-beta1 during growth factor-stimulated fracture healing." Calcif Tissue Int **74**(4): 388-97.
- Wolf, S., P. Augat, et al. (2001). "Effects of high-frequency, low-magnitude mechanical stimulus on bone healing." Clin Orthop Relat Res(385): 192-8.
- Wong, G. L. (1979). "Basal activities and hormone responsiveness of osteoclast-like and osteoblast-like bone cells are regulated by glucocorticoids." J Biol Chem **254**(14): 6337-40.
- Wu, Y., D. T. Denhardt, et al. (2000). "Osteopontin is required for full expression of the transformed phenotype by the ras oncogene." Br J Cancer **83**(2): 156-63.
- Xian, C. J., F. H. Zhou, et al. (2004). "Intramembranous ossification mechanism for bone bridge formation at the growth plate cartilage injury site." J Orthop Res **22**(2): 417-26.
- Yamagiwa, H., K. Tokunaga, et al. (1999). "Expression of metalloproteinase-13 (Collagenase-3) is induced during fracture healing in mice." Bone **25**(2): 197-203.
- Yamaguchi, Y., D. M. Mann, et al. (1990). "Negative regulation of transforming growth factor-beta by the proteoglycan decorin." Nature **346**(6281): 281-4.
- Yamate, T., H. Mocharła, et al. (1997). "Osteopontin expression by osteoclast and osteoblast progenitors in the murine bone marrow: demonstration of its requirement for osteoclastogenesis and its increase after ovariectomy." Endocrinology **138**(7): 3047-55.
- Yang, X., B. F. Ricciardi, et al. (2007). "Callus mineralization and maturation are delayed during fracture healing in interleukin-6 knockout mice." Bone **41**(6): 928-36.

- Ye, L., M. MacDougall, et al. (2004). "Deletion of dentin matrix protein-1 leads to a partial failure of maturation of predentin into dentin, hypomineralization, and expanded cavities of pulp and root canal during postnatal tooth development." J Biol Chem **279**(18): 19141-8.
- Yin, T. and L. Li (2006). "The stem cell niches in bone." J Clin Invest **116**(5): 1195-201.
- Yoshitake, H., S. R. Rittling, et al. (1999). "Osteopontin-deficient mice are resistant to ovariectomy-induced bone resorption." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(14): 8156-60.
- Yoshizawa, T., Y. Handa, et al. (1997). "Mice lacking the vitamin D receptor exhibit impaired bone formation, uterine hypoplasia and growth retardation after weaning." Nat Genet **16**(4): 391-6.
- Young, M. F., J. M. Kerr, et al. (1990). "cDNA cloning, mRNA distribution and heterogeneity, chromosomal location, and RFLP analysis of human osteopontin (OPN)." Genomics **7**(4): 491-502.
- Zaidi, M., A. M. Inzerillo, et al. (2002). "Forty years of calcitonin--where are we now? A tribute to the work of Iain Macintyre, FRS." Bone **30**(5): 655-63.
- Zhang, J., Q. Tu, et al. (2009). "Applications of transgenics in studies of bone sialoprotein." J Cell Physiol **220**(1): 30-4.
- Zhang, X., H. A. Awad, et al. (2008). "A Perspective: Engineering Periosteum for Structural Bone Graft Healing." Clin Orthop Relat Res.
- Zhao, C., N. Irie, et al. (2006). "Bidirectional ephrinB2-EphB4 signaling controls bone homeostasis." Cell Metab **4**(2): 111-21.
- Zhou, G., V. Lefebvre, et al. (1998). "Three high mobility group-like sequences within a 48-base pair enhancer of the Col2a1 gene are required for cartilage-specific expression in vivo." J Biol Chem **273**(24): 14989-97.
- Zhou, Z., S. S. Apte, et al. (2000). "Impaired endochondral ossification and angiogenesis in mice deficient in membrane-type matrix metalloproteinase I." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(8): 4052-7.
- Zhu, Y., D. T. Denhardt, et al. (2005). "Hypoxia upregulates osteopontin expression in NIH-3T3 cells via a Ras-activated enhancer." Oncogene **24**(43): 6555-63.