



HAL
open science

Collagène hydrolysé et santé osseuse

Fanny Guillerminet

► **To cite this version:**

Fanny Guillerminet. Collagène hydrolysé et santé osseuse. Alimentation et Nutrition. AgroParisTech, 2010. Français. NNT : 2010AGPT0059 . pastel-00621193

HAL Id: pastel-00621193

<https://pastel.hal.science/pastel-00621193>

Submitted on 9 Sep 2011

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

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

THÈSE

Pour obtenir le grade de

Docteur

de

L'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement

(AgroParisTech)

Spécialité : Nutrition Santé

Présentée et soutenue publiquement par

Fanny GUILLERMINET

Le 22 septembre 2010

EFFETS DU COLLAGÈNE HYDROLYSÉ SUR LA SANTÉ OSSEUSE

Directeur de thèse : Daniel Tomé

Codirecteur de thèse : Christian Roux

INRA, UMR914 Physiologie de la nutrition et du comportement alimentaire, F-75005 Paris

Composition du jury :

Monsieur Daniel Tomé, Pr, AgroParisTech

Président

Madame Véronique Coxam, INRA, DR, INRA

Rapporteur

Monsieur Pierre Marie, DR INSERM

Rapporteur

Madame Anne Blais, Dr, AgroParisTech

Examineur

Madame Véronique Fabien-Soulé, Rousselot

Examineur

Monsieur Eric Lespessailles, DR INSERM

Examineur

Monsieur Christian Roux, PUPH (chef de service)

Examineur

REMERCIEMENTS

Je remercie Messieurs Daniel Tomé pour m'avoir accueillie au sein de leur laboratoire de l'unité INRA/INAPG de Physiologie de la Nutrition et du Comportement Alimentaire et pour avoir impulsé cette recherche, et Christian Roux d'avoir accepté de co-encadrer cette thèse. Les travaux ont été financés par l'entreprise Rousselot, filiale du groupe VION, et je tiens ici à leur exprimer ma reconnaissance pour leur soutien financier. Je remercie Madame Véronique Fabien-Soulé de m'avoir donné l'opportunité de faire cette thèse avec cette entreprise, pour la sollicitude, le soutien et le professionnalisme dont elle fait preuve à mon égard.

Je remercie Madame Véronique Coxam et Monsieur Pierre Marie d'avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail et pour leur participation à mon jury de thèse auquel s'est joint Monsieur Eric Lespessailles que je remercie également.

Je remercie chaleureusement Madame Anne Blais pour son implication dans le projet, ses formations, ses conseils et ses relectures, qui m'ont été précieux.

Je remercie Monsieur Claude-Laurent Benhamou de m'avoir permis d'utiliser les équipements de son laboratoire à l'Inserm U₆₅₈ de l'hôpital d'Orléans; ainsi que toute son équipe, plus particulièrement Madame Hélène Beaupied, qui m'a formée aux techniques de mesures des paramètres biomécaniques, pour son aide et ses conseils judicieux.

J'exprime ma reconnaissance envers tous ceux avec lesquels j'ai eu l'opportunité de travailler au sein de l'unité de Physiologie de la Nutrition et dans l'entreprise Rousselot; plus particulièrement à François pour son aide précieuse, à Gilles pour ses conseils pertinents mais aussi aux stagiaires que j'ai encadrés et qui m'ont bien aidé. Ma pensée va aussi à Mélanie, à Marine et Quentin, à Sébastien,...

Je remercie aussi mes compagnons de route : Arnaud, avec qui j'ai beaucoup partagé, réflexions de travail, doutes et joies des premiers résultats, Wahiba, Shengua pour sa patience à essayer de m'apprendre trois bribes de Chinois, Géraldine, Montserrat, Najoua, Julie, Julien, Mylène, les Claires, Juliane, Joëlle, Nathalie, Elsa, Astrid, et tous les nouveaux, bon courage à vous tous !

Je remercie surtout ceux de notre sympathique bureau : Magda, Jessie, Nattie, AnSo, et Nad. Rendez vous en Suisse, Italie, Thaïlande, ou ailleurs !

Je remercie les copains et surtout les copines Nutri, en particulier Faboule pour son soutien, son aide et son écoute de colloc !

Et enfin, je remercie bien entendu mes parents, mes deux sœurs et leurs conjoints qui m'ont apporté deux excellentes nouvelles pendant ma rédaction. Le plus fort de mes remerciements est bien sûr pour mon Antoine, qui me soutient au quotidien et que j'ai hâte de suivre dans notre nouvelle vie !

RESUME

Les maladies osseuses liées au vieillissement, telles l'arthrose ou l'ostéoporose, constituent un problème de santé publique. L'augmentation du renouvellement osseux, et le déséquilibre entre la formation et la résorption osseuse en faveur de la résorption consécutive à la chute d'œstrogènes au moment de la ménopause contribuent à l'apparition de l'ostéoporose. Cette maladie est caractérisée par une perte de densité minérale osseuse (DMO) et une altération de la microarchitecture osseuse qui entraînent une augmentation du risque de fracture. Face à ce phénomène, il est important de mettre en oeuvre des stratégies préventives, notamment en développant de nouveaux produits favorisant la santé osseuse.

Le collagène joue un rôle important dans l'organisme, spécialement au niveau de la structure osseuse et du cartilage. Dans ce contexte, se pose la question d'un effet possible du collagène ou des hydrolysats de cette molécule pour limiter les effets de la dégénérescence osseuse.

L'objectif de ce travail est de démontrer l'effet bénéfique des peptides issus du collagène hydrolysé sur le métabolisme osseux en faisant l'hypothèse que ces peptides sont capables de mimer l'action de ceux issus de la dégradation du collagène de type I de la matrice cellulaire osseuse.

Nous avons réalisé une première approche expérimentale pour vérifier s'il pourrait y avoir un effet du collagène hydrolysé sur la croissance osseuse. Nous avons utilisé pour cela des cultures mixtes ostéoclastes/ostéoblastes et étudié la croissance cellulaire ainsi que la différenciation cellulaire. Suite à ce travail, nous avons choisi un modèle de souris C3H/HeN subissant une ablation des ovaires afin de provoquer une chute hormonale et donc une perte de densité osseuse et nous avons confirmé l'effet obtenu in vitro sur ce modèle. Nous avons suivi plusieurs paramètres osseux : la DMO, les marqueurs de formation/résorption et la microarchitecture osseuse.

Nos résultats montrent que les peptides, issus de l'ingestion en prise aiguë ou continue de collagène hydrolysé, modulent l'activité ostéoblastique entraînant un remodelage osseux plus important et favorise la formation osseuse au niveau de la zone corticale fémorale.

Il en résulte une augmentation de la résistance osseuse à la cassure des os des souris en croissance ou une meilleure élasticité des os des souris matures.

De plus, nos résultats suggèrent un effet préventif de la prise de collagène sur la perte de densité osseuse.

Ces résultats mettent en lumière dans les modèles expérimentaux mis en oeuvre l'intérêt de l'ingestion du collagène hydrolysé pour le maintien de la santé osseuse.

ABSTRACT

The osseous diseases related to ageing, such as osteoarthritis or osteoporosis, constitute a true problem of public health. The increase of the bone turn over, and the imbalance between bone formation and resorption, due to the deficiency in estrogens following menopause, contribute to the apparition of osteoporosis. This disease is characterized by a loss of bone mineral density (DMO) and by a degradation of bone microarchitecture which involve an increased risk of fracture. In front of this phenomenon, it is important to develop new products directing toward the promotion of osseous health. Collagen plays an important part in our body, especially on the osseous structure and the cartilage. Consequently it seems interesting to look for the use of collagen or hydrolyzed collagen to limit osseous degeneration.

The objective of this study was to demonstrate the beneficial effect of the peptides derived from the intake of hydrolyzed collagen on bone metabolism. We supposed that these peptides mimes the action of the ones issue from the degradation of the type I collagen of the bone matrix on bone cells.

We carried out a first experimental approach to check if there could be an effect of hydrolyzed collagen on the bone growth. The cell model used to realize this study is a primary culture of osteoclasts and osteoblasts. We studied cell growth and differentiation.

Consequently to this work, we chose a C3H/HeN mouse model which has undergone ovariectomy inducing hormonal deficiency then bone mass density decrease. We followed different bone parameters: DMO, formation and resorption markers, and bone microarchitecture.

Our results showed that the intake in a continuous or accurate way of hydrolyzed collagen modulates the osteoblasts activity. This effect induces an increase of the bone turn over formation of the femoral cortical area.

This phenomenon induces an increase of bone strength in growing mice or a better bone elasticity in mature mice. Moreover, we noticed a potential effect of hydrolyzed collagen intake to prevent bone lost. Theses results confirm the interest of the intake of hydrolyzed collagen in order to maintain bone health.

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS	2
RESUME.....	3
ABSTRACT	4
SOMMAIRE.....	5
TABLE DES ILLUSTRATIONS	8
GLOSSAIRE.....	9
ARTICLES ET COMMUNICATIONS.....	10
ARTICLES.....	10
COMMUNICATION ORALE.....	10
COMMUNICATIONS AFFICHEES	10
INTRODUCTION GENERALE	12
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE.....	14
1. L'OSTEOPOROSE.....	14
1.1 : Définition	14
1.2: Les cellules osseuses	17
1.3: Epidémiologie	22
1.4 : Facteurs de risque	22
1.4.1 : Déterminisme génétique.....	22
1.4.2 : Variables géographique et environnementale.....	23
1.4.3 : Facteurs nutritionnels.....	24
1.4.3.a Calcium.....	24
1.4.3.b Vitamine D	26
1.4.3.c Protéines	26
1.4.3.d Phosphate, vitamine K, magnésium.....	27
2. LES PROTEINES ET LA SANTE OSSEUSE	28
2.1.1 : Impact controversé de la prise protéique sur la santé osseuse	28
2.1.2 : Un régime hyperprotéique entraine une augmentation de la charge acide dans l'organisme.....	29
2.1.3 : La prise protéique augmente le taux circulant de IGF-1.....	30
2.1.4 : Modulation de la balance calcique par les protéines alimentaires	31
2.1.5 : Intéraction des protéines et de la matrice alimentaire.....	32
2.1.6 : La nature des protéines différencie leurs rôles sur le métabolisme osseux.....	33
2.2 : Le collagène	34
2.2.1 : Définition du collagène	34

2.2.2 : Collagènes hydrolysés et gélatines industrielles	35
2.2.3 : Quelques utilisations intéressantes des collagènes et gélatines hydrolysés	37
2.2.4 : Etude de non toxicité	38
2.2.5 : Collagène hydrolysé et ostéoporose	38
2.2.5.a Descriptions de quelques études <i>in vivo</i>	38
2.2.5.b Analyse critique de ces études	39
2.2.5.c Mécanisme d'action	39
MATERIEL ET METHODE	42
I PRESENTATION DES MODELES	42
1.1 Modèle <i>in vivo</i>	42
1.1.1 Choix de l'animal	42
1.1.2 Simulation de l'ostéoporose	43
1.1.3 Paramètres étudiés	44
1.1.3.a : Mesure de la densité minérale osseuse	44
1.1.3.b : Marqueurs du remodelage osseux	45
1.1.3.c : microarchitecture	46
- Propriétés extrinsèques et intrinsèques de l'os	46
1.1.3.d : Evaluation des paramètres biomécaniques de l'os	48
- Test flexion trois points : connaissances actuelles	48
- Présentation du test	48
- Paramètres géométriques	49
- Force et déplacement ou paramètres extrinsèques	50
- Contrainte et déformation ou paramètres intrinsèques	51
- Viscoélasticité du tissu osseux	53
1.2 : Protocole expérimental	54
1.2.1 : Animaux et régimes	54
1.2.2 : Paramètres mesurés	55
2.1 : Modèle <i>in vitro</i>	58
2.1.1 Généralités	58
2.1.2 : Etude de la biologie des ostéoclastes et ostéoblastes	58
2.2. Protocole expérimental	61
RÉSULTATS DE NOS ÉTUDES	63
1. EFFECT OF INGESTED HYDROLYZED COLLAGEN ON BONE METABOLISM AND BIOMECHANICAL PARAMETERS	63
2. HYDROLYZED COLLAGEN IMPROVES BONE STATUS AND PREVENTS BONE LOSS IN OVARIECTOMIZED C3H/HeN MICE	73
DISCUSSION	95
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	104
ANNEXES	105
PROTOCOLE DE LA CULTURE CELLULAIRE :	105

ETUDE IN VITRO PRELIMINAIRE	113
PROTOCOLE POUR L'ETUDE D'UN EVENTUEL EFFET TOXIQUE AU NIVEAU DU REIN	115
BIBLIOGRAPHIE	117

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Architecture d'un fémur normal (à gauche) et atteint d'ostéoporose (à droite)

Figure 2 : Remodelage osseux

Figure 3 : Evolution de la masse osseuse au cours de la vie

Figure 4 : Biologie des ostéoblastes

Figure 5 : Biologie des ostéoclastes

Figure 6 : Ostéoclaste en activité

Figure 7 : Structure en triple hélice du collagène

Figure 8 : Process de la production en hydrolyse acide de gélatine

Figure 9 : Hypothèse de mécanisme d'action

Figure 10 : Système des paramètres intervenant dans le risque de fracture

Figure 11 : Coupe transversale d'un os

Figure 12 : Courbe caractéristique d'une réponse force – déplacement

Figure 13 : Courbe caractéristique d'une réponse contrainte – déformation

Figure 14 : Plan expérimental de la première étude in vivo

Figure 15 : Tableau de composition des régimes

Figure 16 : Plan expérimental de la seconde étude in vivo

Figure 17 : Tableau de composition des régimes

Figure 18 : Protocole de la culture cellulaire primaire

Figure 19 : Hypothèse du mécanisme d'action

Figure 20 : A. Vue ventrale de la cavité abdominale d'une souris femelle B. Localisation des incisions

Figure 21 : Activité de la phosphatase alcaline à 7 jours

Figure 22 : Activité de la phosphatase alcaline à 14 jours

Figure 23 : Poids des animaux à 12 semaines

Figure 24 : DMO des animaux à 12 semaines

GLOSSAIRE

AFSSA : Agence Française de la Sécurité Sanitaire des Aliments
AFSSAPS : Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé
ANRT : Agence Nationale pour la Recherche et la Technologie
BMP : Bone Morphogenic Protein
BMSCs : Bone Marrow Stromal Cells
BMU : Bone Multicellular Unit
CFU-GM : Granulocyte and Macrophage Colony-Forming Unit
CTR : Calcitonine
DMO : Densité de Masse Osseuse
FGF : Fibroblast Growth Factor
IFN : Interféron
IGF: Insuline-like growth factor
IMC : Index de Masse corporelle
OC: Ostéocalcine
ODF: Osteoclast Growth Factor
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
OPG : Ostéoprogérine
M-CSF : Macrophage colony stimulating factor
PA : Phosphatase Alcaline
PTH : Hormone Parathyroïdienne
RANK : activateur du récepteur du ligand NFκB
RANKL : ligand de RANK
SERMs: Modulateur Sélectif des Récepteurs des Estrogènes
TGF : Transforming Growth Factor
THS: traitement hormonal substitutif
TNF : Tumeur Nuclear Factor
TRAP : Acid Phosphate Tartrate Resistant
VNr : Vibronectine Récepteur

ARTICLES ET COMMUNICATIONS

ARTICLES

→ Guillerminet F, Beaupied H, Fabien-Soulé V, Tomé D, Benhamou CL, Roux C, Blais A., Hydrolyzed collagen improves bone metabolism and biomechanical parameters in ovariectomized mice: An *in vitro* and *in vivo* study, *Bone*, 2010 Mar;46(3):827-34

→ Guillerminet F, Beaupied H, Fabien-Soulé V, Tomé D, Benhamou CL, Roux C, Blais A., Accurate or continuous intake of hydrolyzed collagen improves bone metabolism and biomechanical parameters in 3- and 6-month - ovariectomized mice, and may have a preventive role on bone loss
Submitted Int Osteo

COMMUNICATION ORALE

→ Guillerminet F, Beaupied H, Fabien-Soulé V, Tomé D, Benhamou CL, Roux C, Blais A Hydrolyzed collagen and bone health, NutriEvents Jun 2009, Lille

COMMUNICATIONS AFFICHEES

→ ***In vitro* effect of hydrolyzed collagens on bone metabolism**, Fanny Guillerminet, Véronique Fabien-Soulé, Daniel Tomé, Anne Blais, SFN Dec 2007, Lille

→ The effect of the oral intake of hydrolyzed collagen on bone mineral density and the biomechanical parameters of the bones, Fanny Guillerminet, Véronique Fabien-Soulé, Daniel Tomé, Anne Blais, Ecole Doctorale Abies, Mar 2008

→ ***In vitro* effect of hydrolyzed collagens on bone metabolism**, Fanny Guillerminet, Véronique Fabien-Soulé, Daniel Tomé, Anne Blais, Ecole Doctorale Abies, Mar 2008

→Hydrolyzed collagen improves bone metabolism and biomechanical parameters in ovariectomized mice, SFN Dec 2009, Montpellier

→ ***In vivo and in vitro effect of hydrolyzed collagens on bone metabolism***, IOF International Osteoporosis Foundation congress May 2010, Florence, Italie

INTRODUCTION GENERALE

Ce projet a été réalisé dans l'unité INRA/AgroParisTech de Physiologie de la Nutrition et du Comportement Alimentaire, en collaboration avec l'entreprise Rousselot. Il fait l'objet d'un contrat CIFRE subventionné par l'Association Nationale pour la Recherche Technique (ANRT).

Les pathologies osseuses liées au vieillissement, telles l'arthrose ou l'ostéoporose, constituent un véritable problème de santé publique. Déjà fortement implantées dans nos sociétés (200 millions de personnes souffrent de ces maladies dans le monde), l'allongement de la durée de la vie et l'augmentation des facteurs de risque dans les pays occidentaux concourent à accroître l'incidence de ces pathologies. Ainsi les statistiques de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) estiment qu'en 2050 il y aura 4 fois plus de fractures du col du fémur qu'aujourd'hui, soit 6,3 millions de cas par an.

L'ostéoporose est une maladie du squelette caractérisée par une faible densité de masse osseuse (DMO) et une désorganisation de la microarchitecture osseuse. Elle est consécutive à une perte osseuse accélérée induite par un déséquilibre entre la résorption et la formation osseuse. La fragilité de l'os entraîne des fractures qui sont la manifestation clinique principale de la maladie. Les trois fractures principalement rencontrées concernent le col du fémur, les vertèbres et la partie distale du radius.

L'augmentation du renouvellement osseux et le déséquilibre entre la formation et la résorption osseuse en faveur de la résorption, consécutive à la chute d'œstrogènes au moment de la ménopause, contribuent à l'apparition de l'ostéoporose.

Face à cette maladie, des stratégies préventives ou curatives ont été développées. La phase de prévention commence pendant la croissance et dure toute la vie. Elle consiste à assurer les apports adéquats en calcium et vitamine D par le biais d'une alimentation équilibrée et d'avoir une hygiène de vie saine, notamment en évitant les facteurs de risque environnementaux tels que l'inactivité, le tabagisme, etc. Pendant l'enfance et l'adolescence, il s'agit d'assurer sa croissance et d'atteindre un pic de masse osseuse idéal, qui limitera les risques d'ostéoporose pendant la phase de décroissance osseuse. Par la suite à l'âge adulte, pendant la phase de plateau du métabolisme osseux, il faudra prévenir une éventuelle dérégulation du métabolisme osseux et de préparer son organisme à l'arrivée de la ménopause chez la femme.

A la ménopause, si la personne rentre dans la zone de risque accru de fractures, des stratégies curatives sont mises en place, avec prise de médicaments adaptés au patient en fonction de l'état de son métabolisme osseux et de son passif (nombre de fractures).

Cependant, ces traitements sont parfois agressifs pour l'organisme et non exempts d'effets secondaires. Actuellement, la recherche de molécules de substitution plus efficaces que les traitements existants est

en plein essor.

Le rôle des ingrédients nutritionnels face à cette pathologie est intéressant à étudier, puisqu'ils constitueraient un traitement plus doux, préventif essentiellement, et issu de l'alimentation traditionnelle. La prise de ces ingrédients pourrait pallier d'éventuelles mauvaises habitudes alimentaires ou comportementales.

Le collagène joue un rôle important dans notre organisme, au niveau structural de l'os mais il serait aussi impliqué dans la régulation des cellules osseuses. C'est pourquoi nous nous sommes intéressés au rôle du collagène alimentaire et à ses hydrolysats sur le métabolisme osseux et son action éventuellement préventive face à la dégénérescence osseuse.

1. L'ostéoporose

1.1 : Définition

L'ostéoporose est une « affection généralisée du squelette caractérisée par une diminution de la densité osseuse et une altération de la microarchitecture du tissu osseux responsables de l'augmentation de la fragilité de l'os et, par conséquent, du risque de fracture » (définition agréée par l'OMS en 1992).

De plus, l'ostéoporose est caractérisée par une augmentation du renouvellement osseux, avec un déséquilibre entre les activités des ostéoclastes et des ostéoblastes, ce qui entraîne une réduction du tissu osseux : l'os est moins dense pour le même volume, et donc plus fragile (Figure 1).

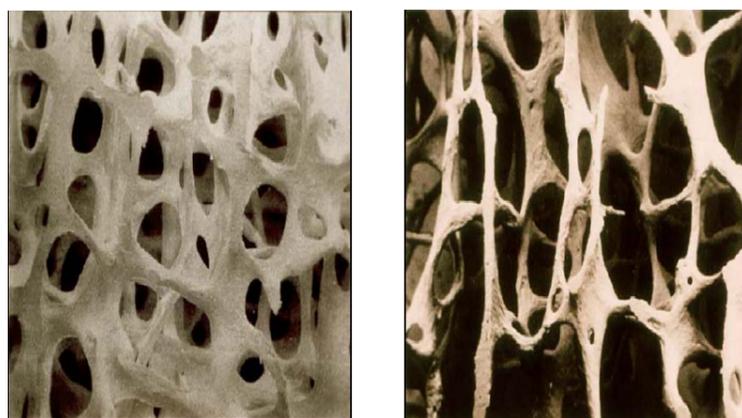


Figure 1 : Architecture d'un fémur normal (à gauche) et atteint d'ostéoporose (à droite)

Le tissu osseux est en constant renouvellement par le biais d'un processus appelé «remodelage» (Bodine et al., 2002).

L'os est renouvelé grâce à des équipes d'ostéoblastes et d'ostéoclastes qui forment une structure temporaire appelée BMU (Basic Multicellular Unit). Chaque année, ces structures renouvellent 10 % du squelette. Au cours de la phase de repos, phase 1, le BMU est recouvert par des cellules bordantes. Cette

phase dure 2 à 5 ans pour une région donnée (Phase 1, figure 2). Cette étape est suivie d'une phase d'activation qui dure une à deux semaines, au cours de laquelle il va y avoir principalement une différenciation des ostéoclastes. Les cellules bordantes se détachent de la surface de l'os et les ostéoclastes adhèrent à la matrice osseuse (Phase 2, figure 2). La différenciation des ostéoclastes engendre une phase de résorption osseuse qui durera une à deux semaines (Phase 3, figure 2). Pendant la phase de réversion, les ostéoclastes se détachent de la surface de la matrice osseuse et subissent une apoptose. Les pré-ostéoblastes se différencient en ostéoblastes matures (Phase 4, figure 2) qui vont synthétiser la nouvelle matrice. Au cours de la dernière phase, les ostéoblastes se différencient en ostéocytes, cellules emprisonnées dans la matrice osseuse, ou en cellules bordantes (Phase 5, figure 2).

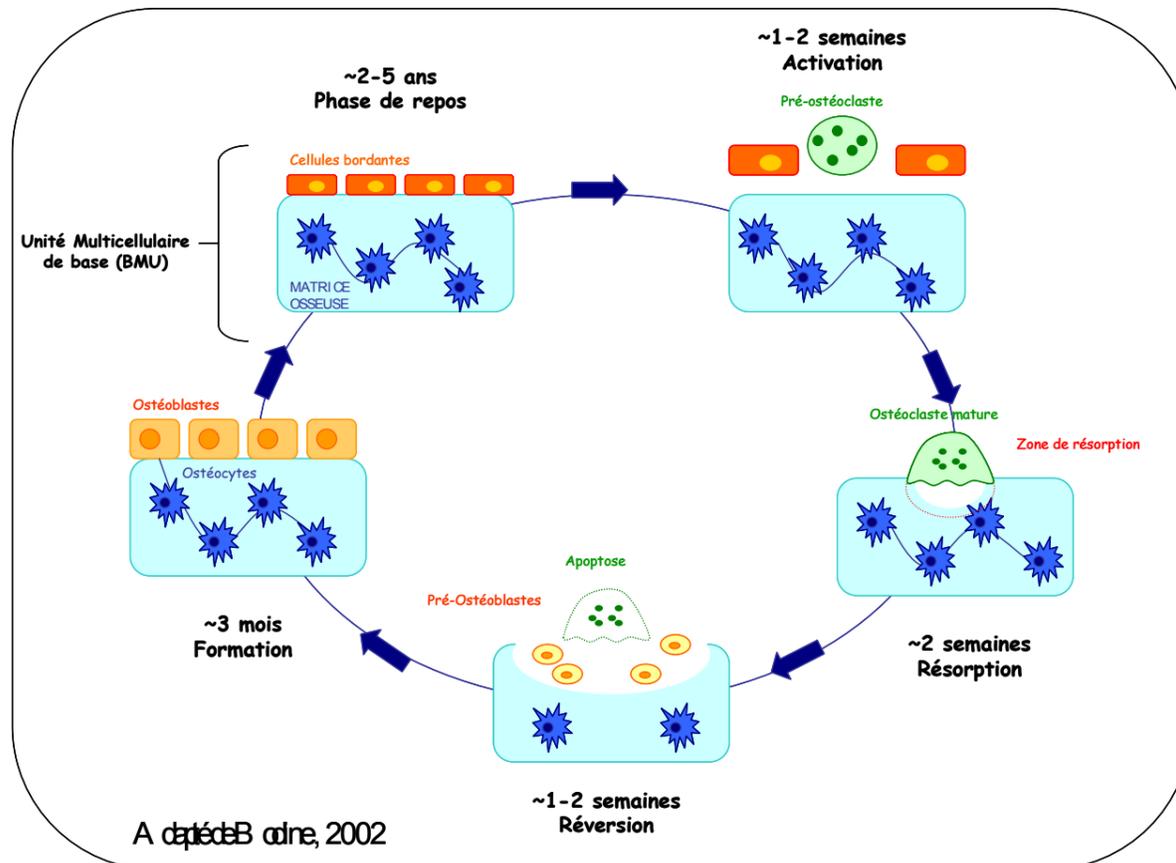


Figure 2 : Remodelage osseux

De la naissance à la sénescence, trois grandes étapes physiologiques (voir figure 3) caractérisent l'évolution de la masse osseuse :

- La première phase (**Phase de croissance**) : Elle commence avec la formation du squelette pendant la vie fœtale et dure jusqu'à l'âge de 20 ans environ. Pendant cette période, la formation prévaut sur la résorption, c'est la période de constitution du capital osseux de base. Le pic de masse osseuse est la

quantité de tissu osseux présent à la fin de la maturation squelettique, et est le déterminant majeur du risque de fracture liée à l'ostéoporose. Le déterminisme du pic de masse osseuse est essentiellement génétique. Les facteurs d'environnement (activité physique, apport alimentaire de calcium) ne rendent compte que de 10 à 20 % du capital osseux, mais ce pourcentage peut avoir un rôle déterminant.

- La deuxième phase (**Phase en plateau**) : elle débute lorsque le pic de masse osseuse est atteint et dure une trentaine d'années, les deux phénomènes s'équilibrent.

- La dernière phase (**Phase de perte osseuse**) : elle apparaît au cours du vieillissement avec une perte progressive d'os de 0,5 à 1 % par an. Chez les femmes, ce phénomène s'accélère après la ménopause. En effet les oestrogènes sont nécessaires pour obtenir un pic de masse osseuse maximale mais aussi pour le maintenir (Smith et al., 2010 ; Rochira et al., 2005 ; Jilka, 1998).

Le renouvellement constant du tissu osseux permet de préserver la qualité de la microarchitecture osseuse. Le phénomène de résorption est donc tout aussi important que la formation. Sans résorption, l'os n'évolue plus. Un turnover élevé laisse présager du bon renouvellement osseux. Mais un ratio formation/résorption négatif témoigne d'une déminéralisation osseuse qui va entraîner une plus grande fragilité de l'os.

DMO relative

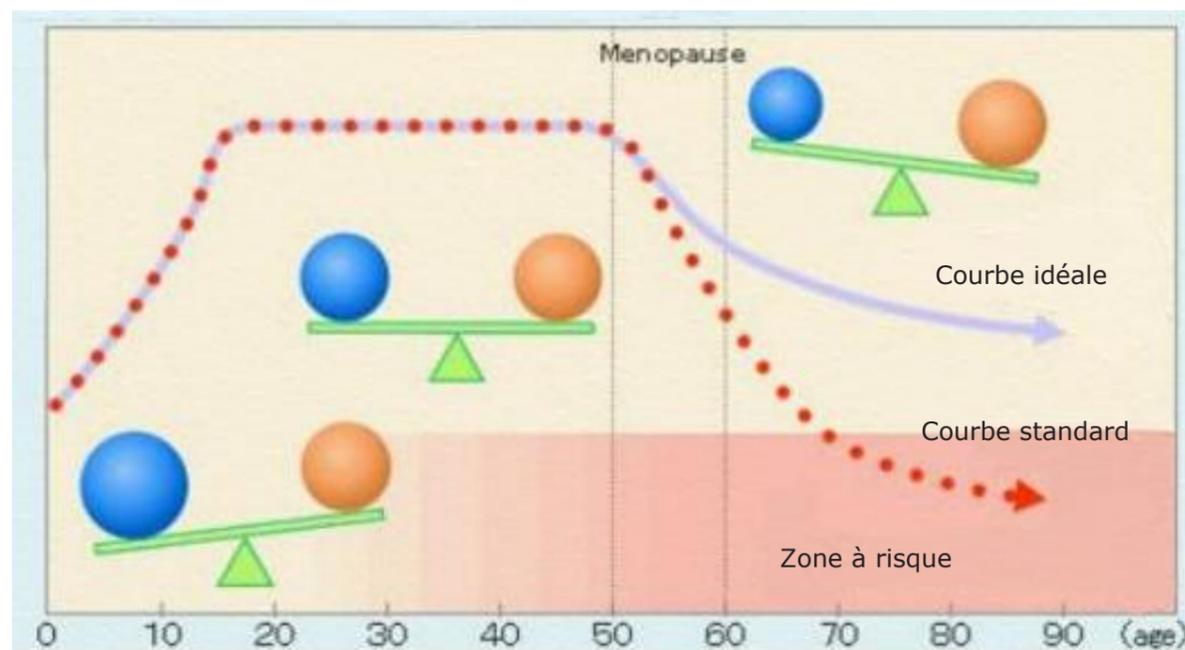


Figure 3 : Evolution de la masse osseuse au cours de la vie

1.2: Les cellules osseuses

Le remodelage osseux dépend de trois grands types cellulaires: les ostéoblastes, les ostéoclastes et les ostéocytes, dont les activités sont interreliées. En effet, les ostéoblastes modulent l'activité ostéoclastique par le complexe de l'activateur du récepteur du ligand NFκB et de son ligand (RANK/RANKL) (Katagiri et Takahashi, 2002), tandis que les ostéocytes modulent à la fois l'activité ostéoblastique et ostéoclastique.

- Les ostéoblastes synthétisent la matrice osseuse nouvelle.

Les ostéoblastes (figure 4) sont des cellules mononucléées responsables de la formation de la matrice osseuse. Le noyau, volumineux, ne contient habituellement qu'un seul nucléole bien visible. Elles dérivent des cellules souches mésenchymateuses pluripotentes d'origine fibroblastique (CFU-F ou colony-forming unit-fibroblast) localisées au niveau de la moelle osseuse. Ces cellules souches peuvent aussi se différencier en adipocytes, chondrocytes, myoblastes et fibroblastes selon les facteurs de transcription exprimés.

Le premier précurseur des ostéoblastes subit plusieurs transformations avant de devenir un ostéoblaste mature. Les préostéoblastes ont toujours la capacité de se diviser, contrairement aux ostéoblastes matures dont la fonction première est de synthétiser la matrice osseuse. Les ostéoblastes matures deviennent ensuite des ostéocytes, des cellules bordantes ou subissent une apoptose (50 à 70 % des cellules).

L'ostéoblastogenèse est régulée par la voie Wnt qui module la différenciation pré-ostéoblastique et leur prolifération. La fixation de Wnt aux récepteurs intramembranaires ostéoblastiques Frizzled (Fz) et LRP5/6 induit une réaction en cascade qui entraîne une accumulation de β-caténine dans le cytosol. La β-caténine va alors induire la transcription des gènes cibles au niveau du noyau (Caetano-Lopes et al, 2007).

Cette voie module la transcription de deux facteurs, Cbfa-1 et Osterix (Osx), essentiels à la différenciation ostéoblastique. En outre, Cbfa-1 module l'expression de l'ostéocalcine.

De plus, il semblerait que la voie Wnt / β-caténine inhibe l'ostéoclastogenèse par la régulation transcriptionnelle de l'OPG (Krishnan et al., 2006), et inhibe la transcription des facteurs intervenant dans l'adipogenèse.

L'activation inappropriée de la voie Wnt semble intervenir dans l'apparition de l'ostéoporose (Cadigan et Liu., 2006).

Des travaux (Stein et Lian, 1993; Owen et al., 1991; Quarles et al., 1992) ont montré que l'activité des

ostéoblastes compte trois phases: une phase de prolifération, suivie d'une phase de formation de la matrice protéique, synthèse du collagène de type I et des protéoglycanes, et enfin une phase de minéralisation de la matrice osseuse, synthèse de l'hydroxyapatite. Plusieurs hormones et cytokines interviennent dans la différenciation cellulaire, tel que le transforming growth factor TGF- β qui est stocké sous forme latente dans la matrice osseuse et relargué pendant la phase de résorption de celle-ci. L'interaction entre le TGF- β et son récepteur ostéoblastique stimule la production du collagène de type I et des protéoglycanes mais inhibe la formation d'hydroxyapatites.

L'activité des ostéoblastes est caractérisée par la sécrétion de collagène de type I. La phosphatase alcaline (PA), la sialoprotéine (BSP ou Bone SialoProtein) ou encore l'ostéocalcine (OC) sont des marqueurs spécifiques des ostéoblastes.

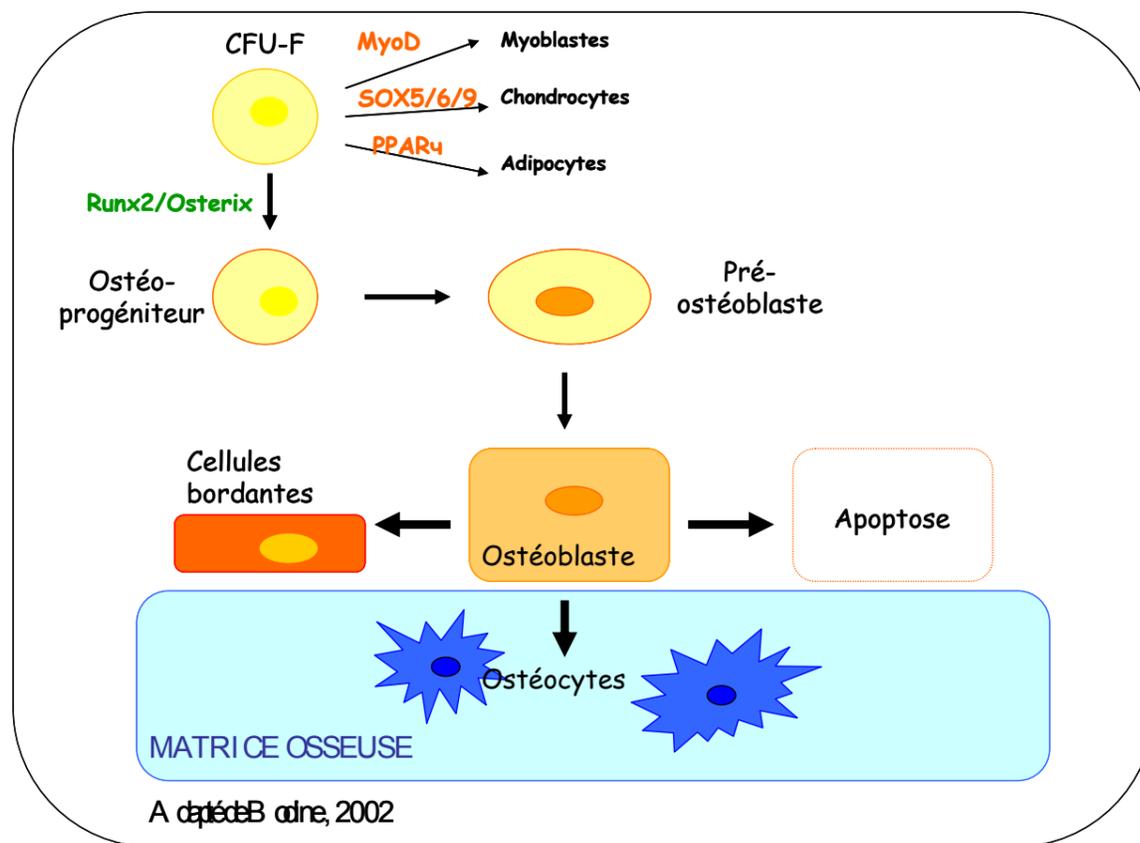


Figure 4 : Biologie des ostéoblastes

- Les ostéoclastes résorbent et détruisent le tissu osseux.

Les ostéoclastes (figure 5), assurant la résorption du tissu osseux, sont des cellules géantes possédant plusieurs noyaux qui proviennent des cellules souches de la moelle osseuse hématopoïétique. Elles forment en 2 à 4 semaines une cavité dans les os minéralisés, la lacune de Howship ou lacune de résorption.

La différenciation des ostéoclastes nécessite des interactions entre les cellules stromales (BMSCs ou Bone Marrow Stromal Cells) et les ostéoblastes. En effet, les cytokines RANKL (Receptor Activator of Nuclear Factor κ B) exprimées par les ostéoblastes et le M-CSF (Macrophage Stimulating Factor) exprimé par les cellules stromales sont indispensables à la différenciation des CFU-GM (Granulocytes and Macrophage Colony-Forming Unit), premier précurseur des ostéoclastes, en ostéoclastes matures.

Le récepteur à la calcitonine (CTR), la TRAP (Acide Phosphatase Tartrate Résistant) et le VNR (Vitronectin Receptor) sont des marqueurs des ostéoclastes.

Les ostéoclastes résorbent le tissu osseux par deux actions distinctes (figure 6) : solubilisation des sels de calcium par la sécrétion d'acides organiques et résorption de la matrice organique par la sécrétion de collagénases et enzymes protéolytiques.

L'ostéoclasie a lieu à l'interface de la surface osseuse et de la cellule (Teitelbaum, 1996; Baron, 1996).

Les ostéoclastes assurent une baisse du pH au niveau de la zone de résorption en relargant des ions hydrogènes par des pompes ATPases permettant la dissolution des minéraux de la matrice osseuse, et exposant ainsi la matrice organique aux enzymes protéolytiques, telles que les collagénases et les cathepsines.

Les ostéoclastes sécrètent alors des métalloprotéases, principalement des collagénases (Teitelbaum et al., 2000), et des enzymes lysosomiales, principalement des phosphates acides, sulfates, glucuronidases, glycérophosphates, cystéines et différentes protéinases (Zhao et al., 2009), dans le compartiment de résorption ostéoclastique.

Les ostéoclastes migrent sur la matrice osseuse, multipliant les zones de résorption, jusqu'à leur entrée en apoptose (Nakamura et al., 1999).

L'ostéoclasie libère le TGF- β prisonnier de la matrice osseuse, qui va alors activer la phase de sécrétion minérale des ostéoblastes en se liant à son récepteur ostéoblastique.

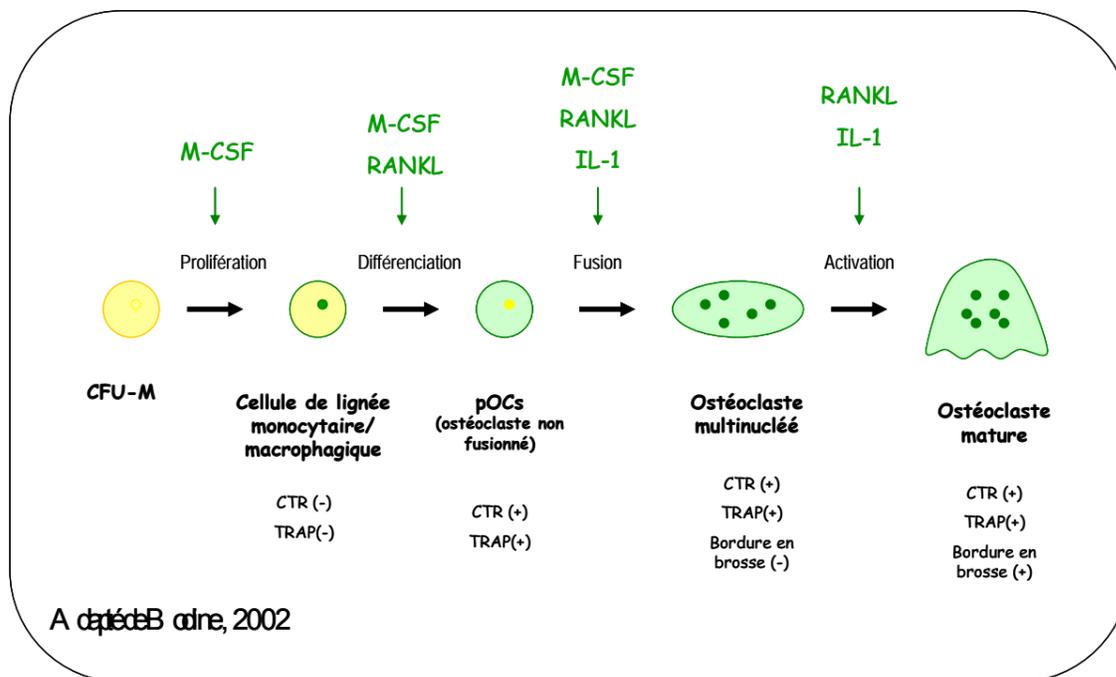


Figure 5 : Biologie des ostéoclastes

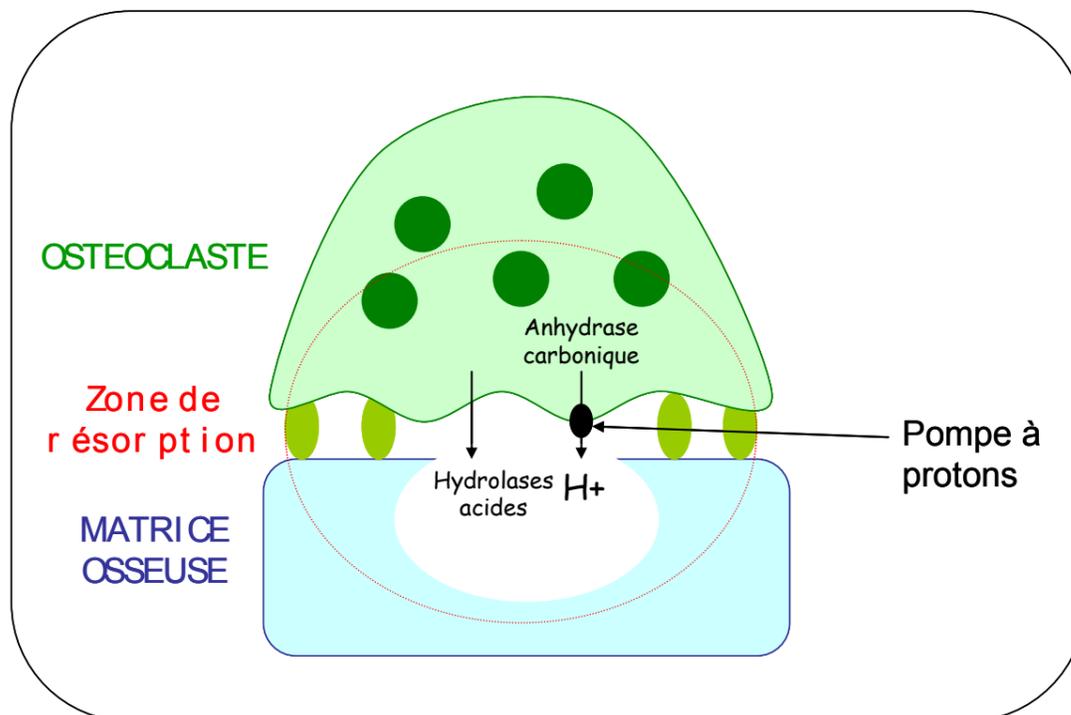


Figure 6 : Ostéoclaste en activité

- Les ostéocytes, régulateurs de l'activité ostéoblastique et de l'ostéoclasie

Les ostéocytes, type cellulaire majoritaire de l'os (90 % des cellules), sont des ostéoblastes devenus prisonniers de la matrice osseuse.

Les ostéocytes réguleraient l'activité ostéoblastique et ostéoclastique (Hartmann, 2006).

De fins prolongements cytoplasmiques des ostéocytes s'étendent dans les canalisations qui rayonnent autour des ostéoplastes. Dans l'os en cours de développement, les prolongements des ostéocytes s'étendent de façon à ce qu'il y ait contiguïté et donc communication entre les ostéocytes voisins et les ostéoblastes. Dans l'os adulte, les prolongements se rétractent presque complètement, mais les canicules persistent afin de fournir un passage pour les échanges de métabolites entre la circulation sanguine et les ostéocytes (Nijweide et al, 1996). Ils participeraient aussi à la mécanotransduction dans l'os (Adachi et al., 2009 ; Jiang et al., 2007).

Lors de la phase de sécrétion de la matrice protéique par les ostéoblastes, certaines de ces cellules se retrouvent emprisonnées par la matrice osseuse, et se différencient en préostéocytes. Ces cellules sont non prolifératives, et sécrètent la phosphatase alcaline, l'ostéocalcine, et des protéines de la matrice osseuse, telle que le collagène de type I. En parallèle de la phase de minéralisation de l'ostéoïde, les préostéocytes se différencient en ostéocytes matures, qui n'expriment plus la phosphatase alcaline et sécrètent de faibles taux d'ostéocalcine et de protéines de la matrice osseuse (Gehron et al., 1992). Cependant, ces cellules restent sensibles à la PTH, et expriment les récepteurs aux œstrogènes (Komm and Bodine, 2001).

1.3: Epidémiologie

« L'ostéoporose constitue, à l'heure actuelle, un problème de santé publique considérable tant par la proportion croissante de femmes qui en est atteinte que par ses répercussions sur la qualité de vie des patients » (INSERM, 1996). Il existe deux types d'ostéoporose :

- L'**ostéoporose de type I**, consécutive à la baisse du taux d'œstrogène due à l'apparition de la ménopause.
- L'**ostéoporose de type 2**, ou ostéoporose sénile, qui concerne les deux sexes après 70 ans. Sa fréquence augmente avec l'âge. Elle est aggravée par plusieurs facteurs : sédentarité, absence d'exposition à la lumière naturelle du soleil (qui permet la synthèse de la vitamine D par la peau), manque de calcium, régime pauvre en protéines. L'ostéoporose peut aussi être causée par un excès d'hormones thyroïdiennes, et peut être aggravée par la consommation d'alcool et de tabac.

En France, on estime qu'il y a environ chaque année 150 000 nouveaux cas de fractures des vertèbres, dont un tiers seulement est diagnostiqué, et 50 000 fractures de l'extrémité supérieure du fémur. Après 50 ans, 40 % des femmes feront une ou plusieurs fractures liées à une fragilité osseuse; et après 80 ans, 70 % des femmes souffrent d'ostéoporose. Selon la Fondation Internationale contre l'Ostéoporose, (International Osteoporosis Foundation), l'ostéoporose concerne 75 millions de personnes en Europe, Etats Unis et au Japon (Fontanas and Delmas, 2001).

Il existe moins de données concernant l'ostéoporose chez les hommes, et il semble que ce phénomène soit négligé devant l'importance de ce problème chez la femme (Wang et al., 1997). Cependant, plusieurs études épidémiologiques ont montré qu'il y a une augmentation de cas chez les hommes, et il semble que certaines fractures arrivent plus fréquemment chez l'homme que chez la femme avant 45 ans (Kudlacek et al., 2000).

1.4 : Facteurs de risque

1.4.1 : Déterminisme génétique

50 % de la variation de la DMO ou du contenu minéral osseux (BMC) sont d'origine génétique. Les facteurs génétiques jouent sur l'acquisition du pic osseux, l'architecture osseuse et la géométrie osseuse (Jonhston and Slemenda, 1998). De plus, l'impact des facteurs génétiques n'est pas le même suivant la localisation du site squelettique concerné (Sambrook et al., 1996).

L'ostéoporose aurait une origine multigénétique (Ferrari et al., 1999). Plusieurs groupes de gènes

peuvent être impliqués, tout particulièrement ceux régulant le métabolisme des oestrogènes, et donc régulant l'apparition plus ou moins tardive de la ménopause, ceux intervenant directement sur le métabolisme osseux, ceux régulant par exemple l'expression des composants de la matrice osseuse, les voies de l'ostéoblastogenèse ou ostéoclastogenèse. L'importance du polymorphisme de plusieurs gènes a été aussi démontré tel que celui du récepteur de la vitamine D (Cooper, 1999), du gène α du récepteur aux oestrogènes module l'âge de l'apparition de la ménopause et la perte osseuse induite (Albagha et al., 2005 ; Ioannidis et al., 2002), mais également celui du gène COL1 α 1 qui régule la densité osseuse de la colonne vertébrale. Le gène codant pour les récepteurs aux oestrogènes ou à la calcitonine et les gènes codant pour cytokines, facteurs de croissance pourraient aussi être impliqués.

1.4.2 : Variables géographique et environnementale

Le risque de développer une ostéoporose varie en fonction de la localisation géographique des individus (Bacon et al., 1996). Le risque de fracture de la hanche est plus élevé chez les patients caucasiens scandinaves que chez les patients d'amérique du nord ou d'océanie (Johnell et al., 1992, Maggi et al., 1991). Au sein même de l'Europe, le risque de fracture peut varier d'un facteur sept d'un pays à l'autre (Ellfors et al., 1994).

Ce facteur géographique dépend non seulement du facteur génétique mais également des facteurs environnementaux. Ainsi, 17 % des femmes caucasiennes post ménopause aux USA, 12 % des femmes d'origine hispanique et 8% des femmes d'origine africaine présentent une fracture de la hanche. Les principaux facteurs environnementaux pouvant moduler l'incidence de l'ostéoporose sont : les habitudes de vie en général, la qualité de l'eau à disposition (et sa composition minérale), l'exposition au soleil, le taux de pauvreté, les habitudes alimentaires et la proportion de l'espace agricole du pays (et donc la disponibilité des aliments). Notons aussi que le risque diffère selon l'origine rurale ou urbaine des individus (Gardsell et al., 1991).

Les facteurs peuvent aussi varier en fonction de la zone du squelette étudiée. Il existe des facteurs aggravants communs. De nombreuses études ont montré que la sédentarité joue sur l'apparition de l'ostéoporose en diminuant la densité osseuse (pas de pression mécanique exercée régulièrement au niveau de l'os), mais aussi en augmentant le risque de chute (perte d'agilité) (Joakimsen et al., 1997 ; Berard et al., 1997 ; Marcus , 1996). D'autres travaux ont montré que l'immobilisation de volontaires sains provoque une diminution de leur masse osseuse (Marcus R, 1996), tandis que les gymnastes adultes ont une densité de masse osseuse en moyenne plus élevée comparée au reste de la population. Les exercices à fort impact sur le squelette sont en général recommandés (Bass et al., 1998 ; Bradney et al., 1998).

La consommation d'alcool ou de cigarettes constitue un facteur aggravant. Des études ont montré qu'en l'absence de différence notable sur la densité osseuse de patients fumeurs ou non fumeurs avant 50

ans, la densité osseuse chez les fumeurs décroît, tous les 10 ans, de 2 % de plus par rapport aux sujets non fumeurs. L'effet de la cigarette sur la DMO s'expliquerait par son rôle sur la perte de poids, et sur le métabolisme des oestrogènes. L'alcool entraînerait une diminution de la DMO en modulant le métabolisme des protéines et du calcium, en augmentant l'immobilité du patient, en modulant ses fonctions gonadales et en ayant un effet toxique direct sur les ostéoblastes, mais son effet reste controversé (Seeman, 1996; Naves-Diaz et al., 1997).

Un index de masse corporel (IMC), comme une perte de poids importante, entraîne une diminution de l'acquisition de la masse osseuse et une perte osseuse accélérée. (Burger et al., 1998, Dennison et al., 1999, Ensrud et al., 1997). Cet effet serait dû à la réduction de la production d'oestrogènes par les tissus adipocytaires chez la femme. Notons que l'anorexie nerveuse, qui provoque une aménorrhée chez la femme, augmente le risque de développer une ostéoporose chez les patients. Tous les facteurs influençant le cycle des hormones sexuelles sont en général à risques : hypogonadisme, apparition prématurée de la ménopause chez la femme (chirurgie), prise de contraceptifs, autres facteurs alimentaires.

1.4.3 : Facteurs nutritionnels

Les principaux facteurs alimentaires capables d'influencer le pic de masse osseuse, la perte osseuse et le risque de fracture sont un apport adéquat en calcium et vitamine D.

1.4.3.a Calcium

De nombreuses études cliniques ont montré un lien entre apport calcique et acquisition de la masse osseuse / risque de fracture.

Chez l'enfant, il a été montré qu'un apport calcique approprié est essentiel pour une bonne acquisition de la masse osseuse à long terme (Bonjour et al., 1997). Chez l'adolescent, des études épidémiologiques ont montré qu'une supplémentation alimentaire en calcium entraîne une augmentation de la masse osseuse (Lloyd, 1996), indépendamment du facteur génétique (les travaux de Johnaton et al., 1992, ont porté sur des jumeaux). Enfin, chez les personnes âgées, si la perte osseuse est essentiellement liée à une carence oestrogénique, la consommation calcique reste corrélée négativement à la perte osseuse (Reid et al., 1993 ; Cumming, 1990), et cela, même si la supplémentation en calcium est effectuée en parallèle d'une prise en THS (Mac Donald et al., 2004). Le déficit en calcium dans cette population étant souvent lié à un déficit en vitamine D, une double supplémentation est conseillée (Chapuy et al., 1994).

L'apport nutritionnel conseillé (ANC) pour le calcium est de 900 mg/jour pour un adulte de plus de 18

ans, mais peut augmenter. Il est de 1000 mg/jour pour les femmes enceintes, allaitantes et juste après allaitement, et de 1200 mg/jour pour les femmes de plus de 55 ans et les hommes de plus de 65 ans. La calcémie étant assurée au détriment du réservoir calcique du squelette, il n'existe pas de signes de carences en calcium évidents, sauf en cas de carences très sévères (qui peuvent entraîner hypocalcémie ou crises de tétanie). Les carences entraînent donc une déminéralisation du squelette.

Des enquêtes alimentaires révèlent cependant que la consommation calcique réelle de la population française est inférieure aux ANC, particulièrement chez les adolescents et les personnes âgées. Ainsi, 20 à 30 % des adolescents, et jusqu'à 50 % des personnes âgées, ont une consommation inférieure aux 2/3 (seuil critique) des ANC (L. Guegen, nutrition et personnes âgées). L'augmentation de la consommation en calcium est un des objectifs du plan national de nutrition santé (PNNS).

Certains facteurs alimentaires sont plus ou moins favorables à la fixation osseuse du calcium absorbé, tandis que d'autres favorisent son excrétion urinaire. La biodisponibilité du calcium dépend donc de son taux d'absorption au niveau intestinal, mais aussi de la capacité du calcium absorbé à être retenu par les os.

Le lait et les produits laitiers servent en général de référence pour la biodisponibilité du calcium. En effet, la présence de lactose augmente l'absorption du calcium. Le coefficient d'absorption réel du calcium du lait, des yaourts et des fromages est de l'ordre de 25-35%. Le lait et les produits laitiers sont les sources d'apport calcique les plus importantes pour la population humaine dans les pays occidentaux, tandis que les céréales, les fruits et les légumes constituent un apport plus marginal. La contribution des produits laitiers à l'apport calcique total est de 73 % au Pays Bas, 51-52 % en Allemagne, 51-52 % aux USA, 57 % au Royaume Unis et 52 % en Irlande. Notons que le calcium des aliments d'origine végétale est en général moins biodisponible que celui des produits laitiers. Il est en effet insolubilisé par l'acide phytique (céréale, son, soja, haricot) et l'acide oxalique (épinard, oseille, betterave, cacao), ou certaines pectines faiblement méthylées. Les fibres ne diminuent pas la biodisponibilité du calcium. Certains végétaux riches en fibres et pauvres en phytates et oxalates, comme le chou, fournissent du calcium de très bonne biodisponibilité. Selon leur consommation, ils peuvent contribuer de façon significative à l'apport calcique total. Par exemple, aux USA, les céréales contribuent à 25-27 % de l'apport calcique total, 25 % au Royaume-Uni. Les poissons en conserve, comme les sardines, sont une source riche en calcium mais participent peu à l'apport calcique total. Notons que l'excès de protéines conduit le plus souvent à une augmentation de la perte urinaire de calcium, parfois masquée par l'effet opposé d'un excès de phosphore (les mêmes aliments étant à la fois riches en protéines et en phosphore)

1.4.3.b Vitamine D

Une déficience sévère et prolongée en vitamine D est à l'origine du rachitisme chez les enfants et de l'ostéomalacie, aggravant l'ostéoporose, chez les adultes. Celle-ci est rare en Europe et aux Etats-Unis, mais est toujours courante au Moyen-Orient et en Asie.

Des études ont montré qu'une carence non sévère en vitamine D est corrélée à une augmentation de la production de PTH, et induit une augmentation du turnover osseux et de la perte osseuse, tandis qu'une supplémentation de cette vitamine agit en prévention de la perte osseuse (Chapuy et al., 1994).

La vitamine D ingérée avec les aliments est absorbée dans l'intestin grêle après incorporation dans des micelles mixtes de sels binaires, d'acides gras libres et de monoglycérides. Cette absorption est lente, 16 à 40 % en moyenne de la dose administrée étant retrouvée dans le sang après 6 à 12 heures.

Proposer des ANC pour la vitamine D reste difficile parce que cette vitamine peut être d'origine endogène, l'épiderme pouvant la produire sous l'action de la lumière. Cependant, des études (Chapuy, 1997 ; American Journal of Clinical Nutrition, 2007) montreraient que 75% de la population française en hiver serait en carence pour cette vitamine. Les ANC sont actuellement de 5µg/j pour les adultes, et 10µg/j pour les personnes âgées.

Les poissons gras, comme les saumons, harengs, sardines, truites arc en ciel et anchois sont la source la plus riche en vitamine D : 10 à 20 µg / 100g. La vitamine D est présente en faible quantité dans certaines viandes, œufs, champignons (0,2-2 µg/100g).

1.4.3.c Protéines

Des études ont montré l'importance du maintien de l'apport protéique sur la masse osseuse (Rizzoli et Bonjour, 1999).

La malnutrition reste courante, particulièrement en Asie et en Afrique, et reste présente dans les pays occidentaux (personnes en dessous du seuil de pauvreté). De plus, il y a une augmentation de la prévalence de malnutrition et sous nutrition chez les sujets âgés.

La malnutrition semble avoir une action directe sur la perte osseuse, mais elle aggrave aussi indirectement l'ostéoporose en diminuant l'IMC, la force des muscles et en augmentant le risque de chute.

Les ANC des protéines sont sujets à controverse et ont été récemment abaissés. Actuellement, l'ANC pour le jeune adulte, sans distinction de sexe, est de 0,8 g/kg/j, ce qui est inférieur à la moyenne de la consommation de la population française.

Les ANC pour les enfants jusqu'à deux ans évoluent de 7 à 11 g/kg/j, puis sont de 0,9 g/kg/j chez l'enfant jusqu'à 10 ans. Chez les personnes âgées, les ANC sont de 1 g/kg/j, seuil légèrement inférieur à la consommation réelle en protéines des personnes âgées en France.

1.4.3.d Phosphate, vitamine K, magnésium

Un apport alimentaire quotidien élevé en phosphate, combiné à un apport faible en calcium, augmente la sécrétion de PTH et induirait un recul de la DMO.

La vitamine K est essentielle à la production du glutamyle présent dans les protéines osseuses, notamment l'ostéocalcine. Le magnésium est nécessaire à la production et à l'activation de la PTH, et modulent donc le métabolisme osseux.

2. Les protéines et la santé osseuse

La perte osseuse liée à l'âge est progressive et peut mener à l'ostéoporose. Si l'apport adéquat de calcium et de vitamine D est reconnu bénéfique pour la santé osseuse, l'impact de la prise alimentaire protéique sur la balance calcique et le métabolisme osseux reste controversé.

2.1.1 : Impact controversé de la prise protéique sur la santé osseuse

L'impact de la prise protéique sur le squelette n'est pas linéaire. Un apport bas est délétère sur la santé osseuse des personnes âgées et un apport excessif est controversé.

La prise calcique et d'autres facteurs alimentaires peuvent influencer l'impact de la prise protéique sur le squelette.

Malgré de nombreuses études portant sur le sujet, l'effet de la prise protéique sur le métabolisme osseux reste controversé. Des questions restent ouvertes: quel est l'effet de la prise protéique sur le métabolisme calcique? Il y a-t-il des différences entre les sources de protéines d'origine végétale ou animale? Il y a-t-il un effet délétère de la prise de régime hyperprotéique sur le métabolisme osseux?

La méta analyse de Darling et al, 2010, qui synthétise les études réalisées sur le sujet au cours des 30 dernières années, nous apportent un éclairage sur ces questions. Elle démontre que, malgré quelques études montrant un effet délétère des régimes hyperprotéiques sur le métabolisme osseux, la majorité de ces études tendraient à montrer un effet bénéfique de la prise protéique sur la santé osseuse.

En effet, les auteurs ont trouvé peu de preuves scientifiques appuyant l'hypothèse d'une relation négative entre la prise protéique et l'os. De plus, si la majorité des études ne montrent pas de corrélation entre prise protéique et les marqueurs de la formation ou de la résorption osseuse, elles montrent plutôt une corrélation positive entre la prise protéique et une amélioration de la densité minérale osseuse de 1 à 2 %. De façon générale, les études ont montré un effet bénéfique ou pas d'effet du tout de la prise protéique sur le risque de fracture de la hanche. Cependant au niveau de la colonne vertébrale les résultats ont montré un léger effet positif entre une supplémentation protéique quelle que soit l'origine de la protéine et la DMO, sans cependant entraîner une baisse du risque de fracture.

2.1.2 : Un régime hyperprotéique entraîne une augmentation de la charge acide dans l'organisme

De façon indiscutable, les protéines alimentaires essentiellement d'origine animale, mais aussi végétale (graines par exemple) sont une source de production d'acides endogènes.

La question est: est-ce que cette production endogène d'acides liée à l'ingestion d'un régime hyperprotéique est suffisante pour affecter l'os?

Les protéines d'origine animale ainsi que celles provenant des céréales ou des noix sont riches en acides aminés soufrés, ce qui contribue à la création d'une charge acide dans l'organisme. Leur apport en phosphore et en chlore contribue également à cette baisse de pH. Notons cependant que le collagène est une protéine animale contenant peu d'acides aminés soufrés ce qui pourrait donc être un avantage dans le cadre de l'ostéoporose.

De nombreuses études se sont intéressées aux effets des protéines alimentaires animales versus végétales sur le métabolisme osseux, mais les résultats sont controversés (Hunt et al., 1989 ; Sellmeyer et al., 2001). Les travaux de Sellmeyer et al., 2001, portant sur 1000 femmes de plus de 65 ans démontrent qu'une augmentation du ratio apport protéines animales / apport protéines végétales entraîne une augmentation de la perte osseuse. A contrario, les études de Massey, 2001, et de Roughead, 2005, montrent qu'un apport de protéines animales versus végétales n'entraîne pas de différence sur l'excrétion calcique ou sur les marqueurs biochimiques du remodelage osseux.

La consommation d'un régime hyperprotéique entraîne une augmentation de la charge acide dans l'organisme via la production de H_2SO_4 issue de l'oxydation des acides aminés soufrés, tels que la méthionine, la cystéine et la cystine. Cette augmentation stimule la résorption osseuse en provoquant la libération d'ions sodium, citrates et bicarbonates de l'enveloppe hydratée de l'os pour tamponner la baisse de pH. En effet, la solubilité de l'hydroxyapatite augmente quand le pH environnemental diminue. Le relargage d'alcalins par le minéral osseux entraîne une diminution de la densité minérale osseuse (Barzel, 1995) qui peut induire une augmentation du risque d'ostéoporose (Barzel and Massey, 1998). L'augmentation de la charge acide de l'organisme s'accompagne de l'augmentation de l'excrétion d'acides au niveau du rein, et par conséquent de l'excrétion de calcium dans les urines.

Les travaux de Chan et al., 1985, montrent que lorsqu'on induit une acidose chronique chez des rats par administration orale d'acide hydrochlorique, la densité ostéoclastique et les surfaces de résorption osseuse augmentent. Arnett, 2003, a démontré in vitro, que les ostéoclastes sont inactifs à un pH de 7,3, qu'ils s'activent à 7,2 et que leur activité est maximale à 6,9. L'activité ostéoclastique est totalement dépendante de l'acidification extracellulaire, ce qui entraîne qu'une variation même légère de pH peut induire une perte osseuse importante dans le temps.

Si certaines études ont montré une légère mais non significative augmentation du pH sanguin chez un groupe d'individus omnivores versus végétariens (donc à apport protéique faible), aucune étude

cliniques ne montre de lien entre la résorption osseuse et la balance acido-basique. Ceci peut s'expliquer par d'autres phénomènes de régulation, via le rein et le système respiratoire, qui jouent un rôle primordial dans la régulation du pH extracellulaire (Bonjour, 2005). De plus, il semble peu probable qu'une baisse de pH à 7,2 (ou activation de l'activité de résorption des ostéoclastes) suive un repas hyperprotéique (Bonjour, 2005). Enfin, les études portant sur les effets d'un changement systémique du pH dans l'organisme par ingestion de doses pharmacologiques de charges acides ou basiques sont physiologiquement très différents de ce qui se passe lors de la modulation de l'apport protéique. En effet, l'apport protéique doit être vu en fonction de l'ensemble de l'alimentation, aussi bien en fonction du temps (on consomme des aliments pendant toute la journée) ainsi aussi par rapport au reste de la matrice alimentaire.

De plus, l'apport protéique aurait aussi des effets positifs sur le métabolisme osseux contrebalançant l'effet de la charge acide.

2.1.3 : La prise protéique augmente le taux circulant de IGF-1

Plusieurs études cliniques ou sur animaux montrent que l'apport protéique est capable de moduler à la fois la production et l'action de IGF-1, et par conséquent peut influencer le métabolisme osseux (Thissen et al., 1994). La dénutrition protéique entraîne une réduction de la concentration plasmatique en IGF-1 en induisant une résistance de l'action de GH au niveau hépatique (Thissen et al., 1994) et en augmentant l'élimination métabolique de IGF-1 (Thissen et al., 1992). De plus, une dénutrition protéique semble rendre les organes cibles de IGF-1 moins sensibles à l'action de celui-ci. L'administration de fortes doses en IGF-1 chez le rat adulte, afin de compenser l'influence délétère du manque d'apport protéique, n'a pas d'effet si l'apport protéique reste insuffisant (Bourrin et al., 2000). Chez la rate adulte, une diminution de l'apport protéique provoque une diminution de la densité de masse osseuse et de la résistance osseuse qui est associée à une baisse de la concentration plasmatique en IGF-1.

Un faible taux sérique en IGF-1 constitue un facteur de risque pour l'ostéoporose (Sugimoto et al., 1997 ; Gamero et al., 2000) et l'augmentation de la prise protéique a un effet préventif sur la baisse du taux de IGF-1 habituellement observé en statut hypocalorique (Jensen, 1982 ; Musey, 1993). On constate une augmentation de 80% des taux de IGF-1 après 6 mois de supplémentation avec 20g protéine/jour chez des patients âgés présentant une ou plusieurs fractures récentes de la hanche (Schurch et al, 1998). La renutrition de patients dénutris augmente le taux de IGF-1 (Schurch et al., 1998 ; Clemmons et al., 1985 ; Clemmons et al., 1985). Les travaux de Ammann et al. (2000) montrent que la renutrition protéique par administration de suppléments en acides aminés augmente le taux de IGF-1 et les marqueurs biochimiques de la formation osseuse, et diminue les marqueurs de la résorption osseuse. Des mesures en μ CT montrent que dans ces conditions, on observe une

augmentation de la densité de masse osseuse et de la résistance osseuse, probablement liée à une augmentation de la zone corticale.

2.1.4 : Modulation de la balance calcique par les protéines alimentaires

Les protéines et le calcium sont les composants majoritaires du tissu osseux. Les os constituent une réserve calcique pour l'organisme humain. Le stock de calcium dans l'organisme adulte représente 1000 à 1200 g dont environ 99 % est contenu par le squelette sous forme d'hydroxyapatite cristallisée et de phosphate calcique amorphe.

De plus, l'os contient à peu près 70% de minéraux, 8% d'eau et 22% de protéines, majoritairement du collagène de type I. Au-delà de leurs rôles passifs de substrat servant à la formation osseuse, le calcium et les protéines alimentaires interviennent dans la régulation du métabolisme osseux.

Le calcium circulant ou calcémie joue un rôle essentiel dans de nombreuses fonctions de l'organisme (excitabilité neuromusculaire, conduction nerveuse, contraction musculaire, coagulation sanguine, perméabilité membranaire, libération d'hormones, activation d'enzymes). La calcémie est maintenue à 2,2 à 2,6 mmol par litre, par le biais de régulations hormonales (parathormone ou PTH, calcitonine, 1,25 dihydroxyvitamine D3 ou calcitriol). Cette homéostasie est prioritaire et se maintient aux dépens du calcium osseux. Environ la moitié du calcium plasmatique est sous forme ionisée, physiologiquement active et sous contrôle hormonal. Un apport inadéquat en calcium réduit le Ca^{2+} circulant et augmente la sécrétion de l'hormone parathyroïde (PTH), hormone polypeptidique à simple chaîne composée de 84 acides aminés, sécrétée par les glandes parathyroïdiennes. Sa sécrétion est stimulée par une baisse de la calcémie plasmatique.

La PTH étant hypercalcémiant, son action conduit à une déminéralisation osseuse quand les apports alimentaires calciques sont insuffisants. Elle a des fonctions variées : augmentation de la capacité d'absorption du calcium au niveau de l'intestin proximal et de la réabsorption du calcium et des phosphates par les tubules rénaux, inhibition de la synthèse et de la sécrétion de l'hormone PTH, stimulation de la différenciation des ostéoclastes. D'où une augmentation du calcium de l'organisme et du calcium plasmatique.

Avec l'âge, le rein est moins performant, la concentration de vitamine D dans le sang diminue, ce qui va provoquer une diminution de l'absorption intestinale du calcium et donc une hypocalcémie qui va stimuler la sécrétion de PTH. Cette augmentation de la PTH circulante stimule la production de cytokines qui régulent la différenciation des ostéoclastes en augmentant leur activité.

L'interaction de la calcitonine sur ses récepteurs ostéoclastiques conduit, en favorisant leur apoptose, à une inhibition de l'action des ostéoclastes. Cette action va favoriser le stockage du calcium par le squelette et abaisser la concentration du calcium disponible dans le sang et les fluides extracellulaires.

Les protéines alimentaires peuvent altérer l'absorption calcique. Kerstetter notamment (1998) montre que l'absorption du calcium est augmentée chez de jeunes patientes nourries avec des régimes hyperprotéiques pendant 4 jours, même si la modulation de la DMO par la prise protéique n'est pas reliée à la prise de calcium (Kerstetter et al., 2001). Cependant, des études montrent que l'apport des protéines alimentaires peut moduler la balance calcique en augmentant l'excrétion calcique par trois mécanismes: hypercalciurie par une baisse de la réabsorption calcique au niveau des tubules rénaux (Sutton et al., 1979 ; Gaffney-Stomberg E, 2010), augmentation de la résorption osseuse par activation des ostéoblastes (Kraut et al., 1986) et par une action directe physicochimique de dissolution de l'os (Bushinsky et al., 2001).

2.1.5 : Interaction des protéines et de la matrice alimentaire

Les effets de l'apport protéique sur le métabolisme osseux dépendraient de la composition de la matrice alimentaire dans son ensemble. C'est pourquoi, plutôt que de considérer l'effet des aliments nutriments par nutriments, il est intéressant de considérer la matrice alimentaire dans son entier (New SA, 2003), notamment la contenance en minéraux (calcium, phosphore, sodium).

La contenance en calcium des aliments influe sur l'effet des protéines. La prise calcique influence l'impact de la prise de protéines alimentaires sur le squelette. Ainsi, si les travaux de Meyer et al, 1997, portant sur 40000 sujets, ne constatent pas d'association claire entre prise calcique et protéique et l'incidence de fractures de la hanche, cependant les sujets avec la combinaison faible prise calcique (< 435 mg/j) et forte prise protéique d'origine non animale (> 20,6 g/jour) présentent un risque deux fois plus important de faire une fracture de la hanche que les autres sujets. Les études menées par Dawson et Hughes (1997), chez des patients sains de moins de 65 ans suivis sur une période de 3 ans concluent à une corrélation prise calcique et prise protéique. Les travaux menés en 2002 par le même auteur, portant sur trois prises protéiques (69, 80, 88 g/jour), montrent que la plus forte prise protéique est associée à des changements favorables de la DMO du col du fémur et du corps total dans le groupe supplémenté en calcium mais pas dans le groupe contrôle et ne constate pas de différence en taux sérique de l'IGF-1.

Ces travaux montrent qu'une prise calcique plus élevée peut réduire, voire annuler l'effet négatif des protéines sur la rétention calcique ou amplifie l'effet positif de IGF-1 et celui autres facteurs du métabolisme osseux. De même, les travaux réalisés par Prominslow et al., 2002, ont montré que dans des conditions d'hypocalcémie, l'augmentation de la prise de protéines augmente la densité de masse osseuse.

Feskanich et al. (1996), et Meyer et al. (1997), ont montré une corrélation positive entre l'apport de protéines et le risque de fracture lorsque la prise de calcium est inférieure à 540 mg/j.

Par contre, Dawson-Hughes (2003 et 2004), a montré que l'apport de protéines alimentaires était

inversement corrélé au taux de perte de masse osseuse chez les personnes âgées supplémentés en calcium et vitamine D.

Une prise calcique élevée en parallèle à une augmentation de la prise calcique permet de compenser les effets de la perte de calcium au niveau de l'os du à l'acidose métabolique.

Le contenu calcique de l'alimentation n'est pas le seul facteur modulant l'effet de la prise protéique sur le métabolisme osseux. La détermination de la charge acido-basique de l'alimentation est un indicateur de l'effet de l'alimentation sur l'os. Une alimentation riche en fruits et légumes réduirait la charge acide de l'alimentation (New SA, 2002, étude DASH). Il y aurait un effet bénéfique de la prise de fruits et légumes et prise de potassium sur la santé osseuse (Jones et al., 2001 ; Tyrvasky et al., 2002, Mc Donald 2001, New SA, 2003). Le ratio protéine/K est un indicateur de l'excrétion acide.

Ainsi, pour déterminer l'effet des protéines sur la santé osseuse, il faut aussi étudier l'alimentation dans son ensemble, et notamment son ratio protéine/Ca et protéines/K.

2.1.6 : La nature des protéines différencie leurs rôles sur le métabolisme osseux

Les protéines de soja auraient un double bénéfice : l'alimentation à base de soja apporte une charge basique et les phytoestrogènes auraient un effet bénéfique sur l'os (Kubota & Shimizu, 2009 ; Coxam, 2008). Mardon et al. (2008) ont montré qu'une supplémentation en citrate de potassium neutralise l'acidose métabolique due à un régime hyper protéique, en diminuant les excrétions en calcium et magnésium. Les produits laitiers, de par leur haute teneur en calcium, avec un apport adéquat en vitamine D, maintiendraient la balance calcique et pourraient prévenir l'apparition de l'ostéoporose (Bonjour, 2005). La lactoferrine, parmi les protéines issues du lait, aurait un effet particulièrement bénéfique sur la santé osseuse (Blais, 2009).

Une supplémentation en lait de 474mL/j augmente de 20% de taux sérique en IGF-1 chez des patientes de 12 ans (Cadogan et al, 1997). Cette augmentation est de 14% après 12 semaines chez des patients adultes consommant 3 portions de lait (=3*237=3* 9g de protéine et 300 mg de calcium mL)/j (Heaney et al, 1999).

2.2 : Le collagène

Le collagène joue un rôle important dans notre organisme, spécialement au niveau de la structure osseuse et du cartilage. Les protéines constituant le tissu osseux se trouvent principalement sous forme de collagène de type I. L'utilisation de collagène ou d'hydrolysat de collagène, en tant que complément alimentaire, afin de limiter les effets de la dégénérescence osseuse, semble une piste intéressante.

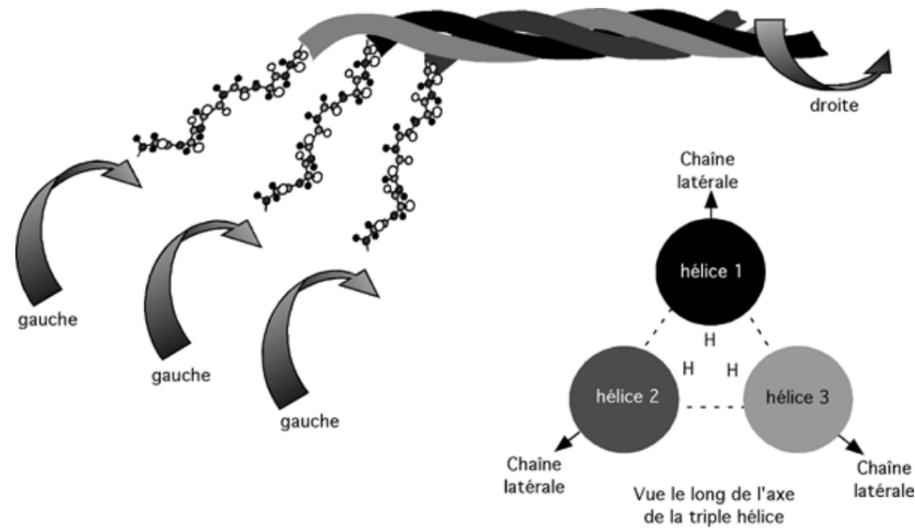


Figure 7 : Structure en triple hélice du collagène

2.2.1 : Définition du collagène

Le collagène est la protéine la plus abondante chez les mammifères, il représente 25 % des protéines totales de l'organisme chez l'homme. Il forme la majeure partie des constituants protéiques de la peau, des tendons, du cartilage, des os, et plus généralement du tissu conjonctif (80 % du poids du tissu conjonctif est constitué de collagène). Le collagène est généralement considéré comme une protéine « pauvre » car il ne contient pas ou très peu de tryptophane, de tyrosine et d'acides aminés soufrés. Cependant, le collagène est une source riche en glycine, proline, hydroxyproline, lysine et en hydroxylysine.

La synthèse du précollagène a lieu dans les chondrocytes du cartilage et dans les ostéoblastes de l'os. Ce précollagène est ensuite coupé avant de subir des elongations, puis les chaînes formées s'associent

avant d'être excrétées.

La molécule de collagène est une microfibrille constituée de trois sous-unités: trois hélices comptant chacune 1 050 acides aminés et tournant l'une autour de l'autre en une super hélice orientée dans le sens de la main droite. La structure en triple hélice (figure 7) est stabilisée par des ponts hydrogènes entre les hélices. La structure primaire du collagène est caractérisée par une abondance en glycine (toutes les 3^e positions) et proline.

La structure quaternaire est dépendante de la présence d'hydroxyproline. En absence de cet acide aminé, la triple hélice est instable et ne se forme quasiment pas à température corporelle. L'hydroxylation de la proline a lieu dans le réticulum endoplasmique, pendant la maturation du collagène, et dépend elle-même de la présence d'acide ascorbique (vitamine C). Une carence en vitamine C conduit alors à une mauvaise synthèse de collagène, ce qui entraîne une fragilisation des vaisseaux sanguins, des tendons, de la peau (symptômes caractéristiques du scorbut).

Les différents types de collagène connus diffèrent par leur structure primaire, mais possèdent tous de l'hydroxyproline et de l'hydroxylysine.

Le collagène de type I représente 90 % du collagène chez les vertébrés. Il se retrouve dans la plupart des tissus conjonctifs : il est abondant dans le derme, les os, les tendons, les ligaments, la cornée et les organes internes. Il constitue la trame de l'os, et plus généralement des tissus conjonctifs. Il forme des fibres épaisses, larges et résistantes. Sa propriété principale est la résistance à la traction. C'est le type de collagène auquel on s'intéressera dans notre étude.

Cependant, il existe d'autres types de collagène, tel que le collagène de type II qui forme des fibrilles plus minces que le collagène de type I. C'est le collagène du cartilage.

2.2.2 : Collagènes hydrolysés et gélatines industrielles

Le collagène natif est utilisé depuis longtemps, notamment en agroalimentaire, mais est difficilement absorbé au niveau de l'intestin. Pour pallier à ce défaut, on effectue une hydrolyse du collagène, l'hydrolyse permettant d'abaisser son poids moléculaire. Selon le degré d'hydrolyse du collagène, on obtient de la gélatine ou du collagène hydrolysé.

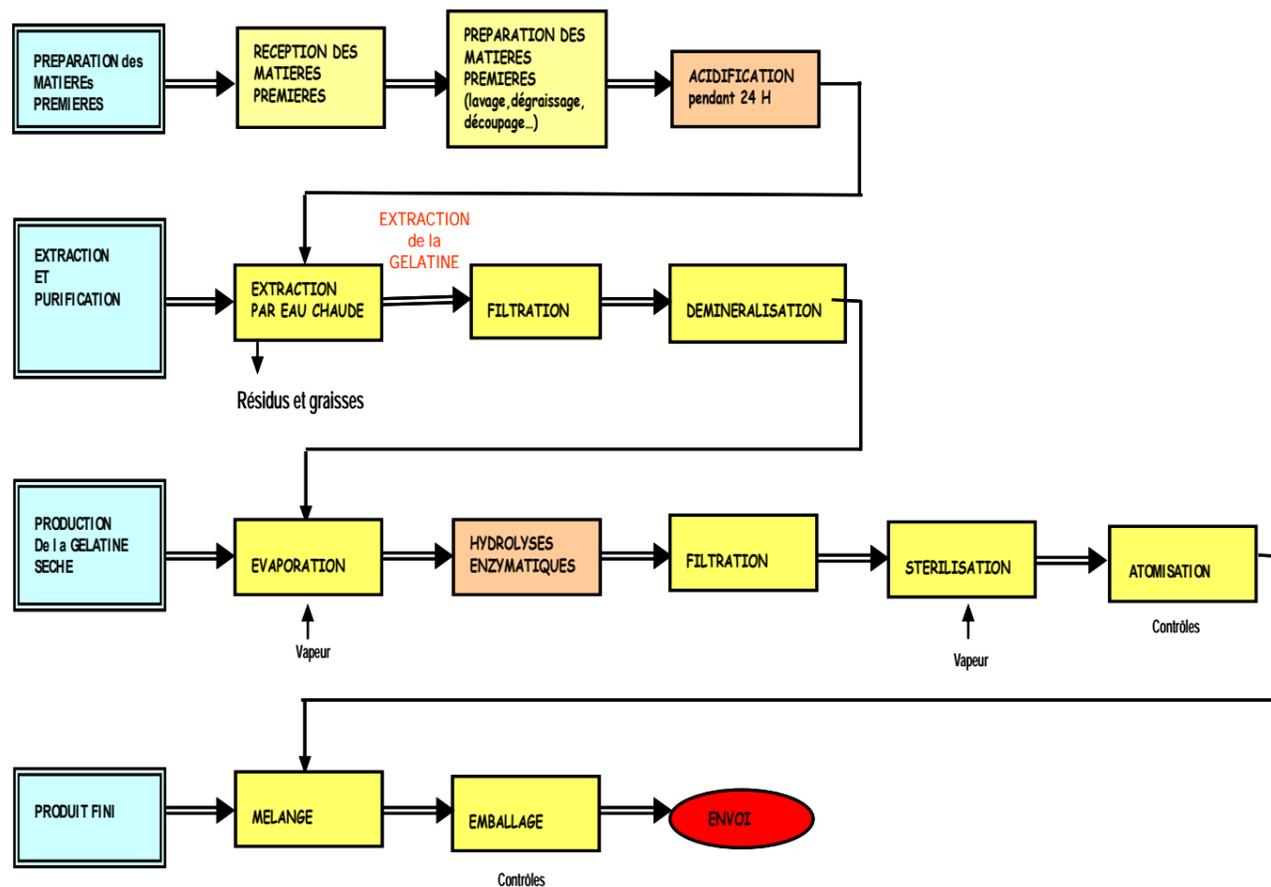


Figure 8 : Process de la production en hydrolyse acide de gélatine.

La gélatine est une protéine contenant 1 à 20 fois plus de glycine et proline que les autres protéines. La production mondiale est de 250 000 tonnes par an. Les collagènes hydrolysés et les gélatines industrielles sont obtenus à partir de peaux, os, cartilages ou ligaments de bœuf et porc essentiellement, mais aussi à partir de poissons et de volaille. Le process de fabrication (figure 8) se scinde en trois étapes essentielles : le prétraitement de la matière première et l'élimination des impuretés, l'extraction et le raffinement. La matière première est lavée, dégraissée, puis acidifiée afin d'éliminer le calcium et autres minéraux. Selon la qualité de la matière première, des traitements différents sont effectués. Pour une matière de composition simple, c'est-à-dire peu réticulée, un traitement acide court suffit. Pour des matières plus complexes, plus réticulées, un traitement alcalin plus long est effectué. Des traitements enzymatiques, plus novateurs, peuvent remplacer le traitement alcalin. Ils sont plus rapides, plus efficaces et le produit fini est de meilleure qualité. L'extraction se fait par hydrolyse basique ou acide en bains successifs, à chaud. Puis le raffinement du produit est effectué (filtration, clarification, évaporation, stérilisation, séchage, broyage et tamisage).

Le collagène hydrolysé est de plus bas poids moléculaire que la gélatine, ce qui augmente ses propriétés de mouillabilité et de dispersibilité dans les liquides et indépendamment de la température, ce qui

augmente aussi son pouvoir de dissolution. Le collagène hydrolysé utilisé dans nos études, est un mixte de petits peptides de poids moléculaire moyens entre 2 000 et 5 000 Da. Il a été fourni par la société Rousselot.

2.2.3 : Quelques utilisations intéressantes des collagènes et gélatines hydrolysés

- Usage en tant qu'ingrédients alimentaires

Les gélatines et collagènes hydrolysés sont amplement utilisés en agroalimentaire, pour leurs propriétés gélifiantes, mais aussi pour leurs effets épaississants, stabilisants, et comme agent texturant. Ils sont présents dans les crèmes glacées, les confitures, yaourts, margarines, et produits allégés, où ils remplacent les matières grasses tout en laissant la même sensation en bouche.

- Usage pharmaceutique et médical

La gélatine est le principal matériau imitant le tissu humain. Des blocs de gélatine sont d'ailleurs utilisés pour imiter le corps humain lors de crash test par exemple. Au niveau médical, il est utilisé en substitution pour simuler les tissus biologiques. Elle peut servir de substitut de plasma sanguin, comme prothèse de vaisseau sanguin, etc. Plus couramment, elle est utilisée pour encapsuler les médicaments et les protéger de la lumière et du milieu extérieur. Enfin, il est vendu en tant que complément alimentaire comme réducteur de douleur pour les problèmes d'arthrose et d'articulations.

2.2.4 : Etude de non toxicité

Le collagène est un produit agroalimentaire courant, il ne présente pas d'effet délétère à long terme et est reconnu comme GRAS (Generally recognised as Safe) par le Food and Drug Administration (FDA).

Cependant, plus récemment, Wu et al., 2004, a noté qu'une administration de collagène hydrolysé 100 fois supérieur à la dose recommandée pour les suppléments (ce qui correspond à une dose de 16,6 g/kg de masse corporelle/jour) pourrait entraîner une hypertrophie des reins.

La formation de cristaux d'oxalate calcique endommage le rein (Yamagushi et al., 2005). L'augmentation de la synthèse d'oxalate et une hyperoxalurie induisent la formation de ces cristaux dans le rein. L'hydroxyproline, acide aminé majoritaire de la gélatine et du collagène hydrolysé, serait un précurseur du glycoxylate, lui-même précurseur de l'oxalate.

Des travaux ont montré qu'une ingestion de forte dose de gélatine (30 g/j) entraîne une augmentation de l'excrétion urinaire de glycolate (3 à 5 fois plus) et d'oxalate (augmentation de 43%), et favoriserait donc l'apparition de cristaux dans le rein. A doses fortes mais moins élevées (5-10g/j), on voit des perturbations sur la synthèse de l'oxalate (augmentation de la sécrétion urinaire), mais pas d'effet délétère. A doses équivalentes à 1-2g/j, il n'y a plus de variation significative sur l'excrétion d'oxalate.

Aux doses recommandées et consommables dans une alimentation normale, il n'y a pas de risque d'effet délétère de l'ingestion de gélatine sur le rein.

2.2.5 : Collagène hydrolysé et ostéoporose

2.2.5.a Descriptions de quelques études in vivo

Peu d'études portent sur l'action de la prise de collagène hydrolysé dans le cadre d'une prévention de l'ostéoporose.

La prise de collagène hydrolysé aurait un effet protecteur sur la masse osseuse, dans le cadre d'un régime hypoprotéiné (Koyama et al., 2001), ou déficient en calcium (Wu et al. , 2004). Les résultats de la première étude montrent que la DMO des fémurs est significativement plus élevée pour les groupes suivant le régime composé de 6 % caséine + 4 % gélatine que pour le groupe suivant le régime composé de 10 % caséine. Par contre, il n'y a pas de différence significative de DMO entre les groupes suivant les régimes composés de 14 % caséine et celui de 6 % caséine + 8 % gélatine. Ces résultats suggèrent que l'apport de gélatine, lorsque le régime est pauvre en protéine, est capable d'augmenter significativement la DMO. Cet effet serait moins évident lorsque l'apport en protéines est adéquat.

Les résultats de la deuxième étude montrent que la DMO du fémur chez les animaux suivant un régime contenant 1,66 g de collagène hydrolysé/kg de poids corporel/jour et 0,2% de calcium est

significativement plus élevée que celle des groupes ayant un régime à basse teneur en calcium sans collagène, et équivalente à celles des animaux suivant un régime ayant une teneur normale de calcium. Ces résultats suggèrent donc que l'apport de collagène hydrolysé a un effet bénéfique sur le métabolisme osseux en condition de déficience calcique.

Les travaux de Nomura Y et al. (2005) menés sur des rates ovariectomisées, montrent que l'ingestion de 20 mg de gélatine par jour diminue la perte osseuse post ménopausique. L'ingestion de collagène inhiberait l'activité ostéoclastique. En effet, des études ont montrées une baisse significative des concentrations de pyridinoline et de deoxypyridinoline dans l'urine des patients recevant du collagène hydrolysé par rapport à ceux recevant le placebo. De plus, une étude réalisée sur des femmes ménopausées a montré un effet synergique du collagène hydrolysé et de la calcitonine sur l'inhibition de la résorption osseuse (Adam et al., 1999 ; Moskowitch et al., 2000). La prise de collagène hydrolysé ou gélatine serait aussi associée à une augmentation de la synthèse de collagène I et de protéoglycanes (Nomura et al., 2005).

Cependant, ces études ne clarifient pas le mécanisme d'action des peptides issus de l'ingestion du collagène hydrolysé sur le métabolisme osseux.

2.2.5.b Analyse critique de ces études

L'ensemble de ces études suggère que l'apport de collagène accroît la densité de masse osseuse, spécialement dans des conditions de déficience en calcium, dénutrition protéique ou associé à la prise de calcitonine et de caséine. La dose recommandée admise est de 0,166 g/kg masse corporelle/jour, c'est-à-dire de 10 g/j pour une personne de 60-70 kg. Cette valeur est utilisée dans la plupart des expériences. Noruma, 2005, a trouvé une valeur optimale de 20mg/100g de masse corporelle/jour (par rapport à des doses de 10 à 40 mg/100g de masse corporelle/jour).

Les conditions expérimentales des études ne sont donc pas homogènes : les modèles animaux diffèrent (souris mâles ou rates ovariectomisées selon les études), ainsi que les régimes associés à la prise de collagène plus ou moins hydrolysé. La provenance du collagène diffère selon les études (par exemple, Koyama utilise de la gélatine de porc, tandis que Nomura utilise de la gélatine de poisson). De plus, le type de collagène (I ou II) n'est pas toujours précisé.

2.2.5.c Mécanisme d'action

Le mécanisme d'action précis n'est pas encore élucidé. Cependant, plusieurs études permettent de proposer une hypothèse concernant le mécanisme par lequel le collagène hydrolysé pourrait moduler le métabolisme osseux.

Tout d'abord, notons que le collagène hydrolysé est pauvre en acides aminés essentiels, notamment le tryptophane et ses dérivés. Cependant, il contient une grande quantité en hydroxyproline, ce qui est assez rare dans les autres protéines. Les dérivés peptidiques du collagène principalement retrouvés dans l'organisme (dans le sang ou au niveau des cartilages) ont été identifiés comme étant essentiellement riches en hydroxyproline. L'hydroxyproline de l'organisme étant modifiée post translationnellement à partir de la proline du collagène, l'effet du collagène hydrolysé ne peut donc pas être attribué à un apport en hydroxyproline.

Il a été montré in vitro que le collagène de type I influence l'expression du phénotype des cellules osseuses (figure 9). Ainsi, Andrianarivo, 1992, a étudié les effets du collagène de type I sur la différenciation ostéoblastique à l'aide d'un modèle cellulaire, MG-63. Des dosages de phosphatase alcaline et d'ostéonectines (molécules qui lient le collagène aux minéraux dans la matrice osseuse) ont été réalisés. La présence de collagène de type I augmenterait l'activité de la phosphatase alcaline. Les résultats suggèrent que la matrice osseuse extracellulaire influencerait la différenciation ostéoblastique par l'intermédiaire du collagène de type I.

Lynch, 1995, a réalisé une étude ayant des résultats similaires : l'expression de différents marqueurs cellulaires (fibronectine, intégrine bêta 1, actine, ostéonectine, ostéocalcine, et ostéopontine) a été étudiée sur des cultures d'ostéoblastes sur films de collagène de type I, comparativement à des cultures classiques sur films plastiques. Les résultats montrent notamment qu'il y a une augmentation deux à trois fois plus importante de la phosphatase alcaline pour les cellules mises en culture sur films de collagène de type I, par rapport aux cultures sur films plastiques, pendant la phase de prolifération. On constate aussi une minéralisation uniforme et accélérée de la matrice osseuse.

Mizuno, 2001, a plus récemment mené des travaux afin de préciser le mécanisme d'action du collagène de type I sur les ostéoblastes. Les études ont été menées sur des cultures cellulaires primaires sur film de collagène de type I. La précipitation de calcium dans les milieux de culture a été déterminée, et l'expression des gènes marqueurs de l'activité des ostéoblastes a été étudiée par Northern-blot (phosphatase alcaline, ostéocalcine, sialoprotéine, ostéopontine, cbfa-1). Le collagène synthétisé a été déterminé par mesure de la radioactivité d'une protéine collagénase. Les résultats ont montré que le collagène de type I entraîne une différenciation ostéoblastique des cellules de la moelle osseuse. Ces résultats confirment ceux d'Andrianarivo et al., 1992, et de Lynch et al., 1995.

Dans un deuxième temps, Mizuno, 2001, a tenté d'identifier le récepteur cellulaire qui serait responsable de moduler les effets du collagène de type I. Cette étude a été menée en introduisant dans le milieu de culture des peptides connus pour interagir avec le récepteur intégrine $\alpha 2\beta 1$. Ces résultats suggèrent que l'enchaînement d'acides aminés composé de l'asparagine, glycine, glutamine et alanine (DGEA) présent dans la molécule de collagène pourrait interagir avec le récepteur de l'intégrine $\alpha 2\beta 1$, pour induire la différenciation des cellules préostéoclastiques de la moelle. Les résultats sont en accord

avec ceux précédemment rapportés par Takeuchi et al., 1997, et Xiao et al., 1998.

L'ensemble de ces travaux tend à montrer que le collagène de type I de la matrice extracellulaire osseuse favorise la différenciation ostéoblastique. Cependant, actuellement, aucune étude ne montre que le collagène hydrolysé alimentaire influence de la même façon la différenciation des ostéoblastes.

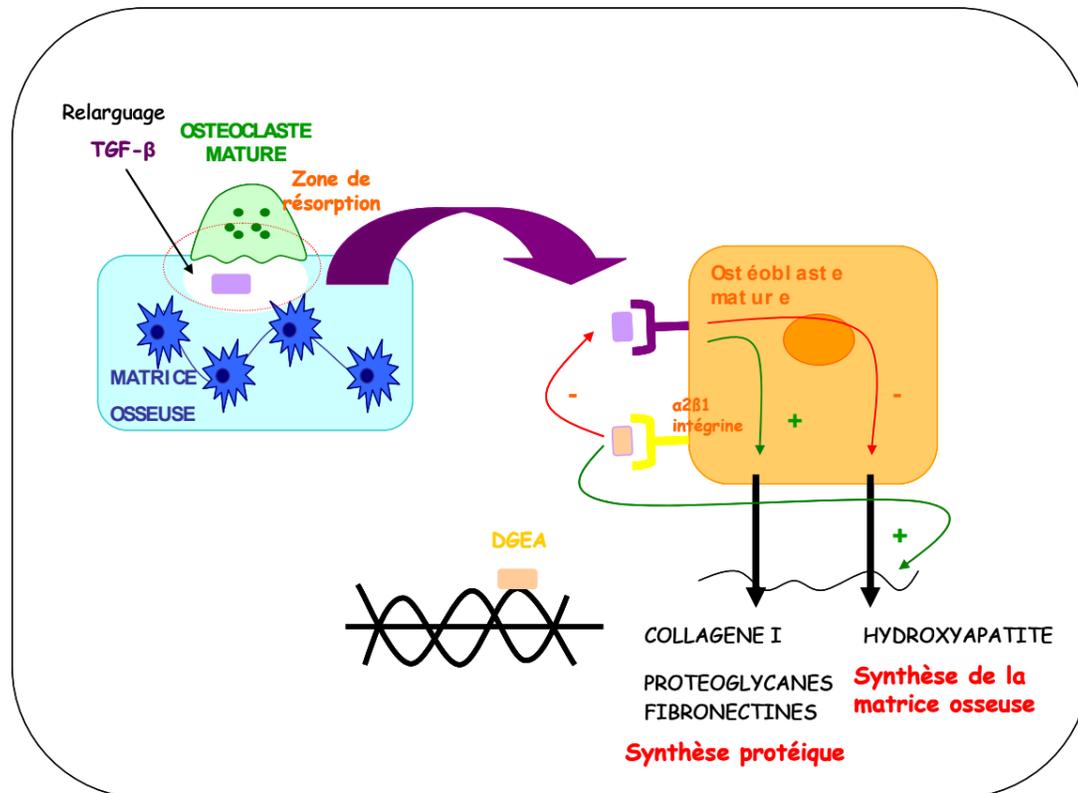


Figure 9: hypothèse d'action

MATERIEL ET METHODE

I PRESENTATION DES MODELES

Dans cette partie, nous allons expliquer la mise en place des modèles expérimentaux utilisés.

1.1 Modèle *in vivo*

L'étude préclinique de facteurs alimentaires ou autres, limitant la perte osseuse associée à l'ostéoporose, est effectuée sur modèle animal ayant un métabolisme osseux et des conditions physiologiques proches de l'humain.

Cependant, le modèle animal, même s'il s'avère précieux pour mieux comprendre comment prévenir et traiter les phénomènes ostéoporétiques, possède ses limites (Rubin et al, 1999). Le métabolisme osseux, même s'il se rapproche de l'humain, ne peut être identique. Taille, composition et architecture osseuse diffèrent, ainsi que les forces quotidiennes appliquées aux os, puisque les modèles animaux sont quadrupèdes. Certains animaux, comme les rongeurs, ne présentent pas d'arrêt de croissance à un certain âge. Même si celle-ci peut fortement diminuer, l'animal est en croissance jusqu'à sa mort. De plus, les rongeurs n'ont pas de ménopause naturelle. Enfin, les animaux en général ne présentent pas de fracture naturelle suite à une ostéopénie.

Il en résulte que le modèle animal utilisé simule une dégénérescence longue et naturelle chez l'homme par une perturbation brutale non physiologique chez l'animal.

1.1.1 Choix de l'animal

- Modèle rat:

Le modèle rat est le modèle le plus largement répandu (Coxam, 2003). Ne présentant pas de ménopause naturelle, on pratique généralement une ovariectomie. Ce modèle est pratique, peu cher, les animaux ont une durée de vie faible qui permet d'étudier les maladies dégénératives liées à l'âge. Il présente une grande similarité avec le métabolisme osseux humain. Après ovariectomie, on observe une perte osseuse associée à une modification rapide de l'os spongieux, une augmentation du turnover osseux et une modification du réseau trabéculaire, similaires à celles observées chez l'homme lors de

l'ostéoporose.

Cependant, contrairement aux humains, la croissance osseuse des rats est ralentie chez l'animal âgé mais continue. La zone corticale n'est pas structurée en canaux Harversiens et se remodèle peu.

- Modèle souris :

La souris est un modèle pratique, peu cher, l'animal se reproduit vite et présente une durée de vie courte. Le modèle murin est bien connu et maîtrisé génétiquement. Il présente la possibilité d'utiliser des souris transgéniques et de multiples souches sont disponibles selon les caractéristiques osseuses que l'on souhaite étudier. Enfin, la souris présente un métabolisme osseux proche de celui de l'humain.

Pour l'étude de l'os cortical, deux souches de souris sont particulièrement intéressantes à étudier puisqu'elles sont représentatives des deux extrêmes : la souche C3H/HeN présente, au niveau du fémur, un ratio os cortical / os trabéculaire élevé, et subit un remodelage osseux au niveau de la zone corticale de l'os, tandis que la souche C57/BL6 présente, au niveau du fémur, un ratio os cortical / os trabéculaire faible, constitue un bon modèle d'étude de la zone trabéculaire osseuse. De plus, il y a un remodelage osseux intracortical chez la souris C3H/HeN qui constitue un modèle pertinent d'étude de la modulation de l'os cortical au niveau fémoral.

- Autres modèles:

D'autres espèces, autres que les rongeurs, présentent des caractéristiques intéressantes pour l'étude de la perte osseuse associée à l'ostéoporose. Le chien a un squelette et une répartition os cortical / os spongieux analogue à celui des humains. Cependant, une chute en œstrogène semble peu affecter le métabolisme osseux dans ce modèle. Le cochon est un modèle intéressant puisqu'il présente des caractéristiques squelettiques similaires aux humains (remodelage osseux trabéculaire et intracortical), et un cycle hormonal similaire aux humains. Cependant, la densité osseuse est beaucoup plus élevée que chez l'homme, et un réseau trabéculaire beaucoup plus dense. La microarchitecture osseuse et la réponse osseuse à l'ovariectomie du mouton sont similaires à celle de l'homme, mais son squelette subit des variations saisonnières. Les primates, dont l'organisme, le cycle menstruel sont similaires à l'homme et qui ont une posture « debout », présentent un modèle intéressant mais compliqué (durée de vie longue, peu pratique, plus cher).

1.1.2 Simulation de l'ostéoporose

Deux modèles d'études sont possibles pour provoquer un dysfonctionnement du métabolisme osseux : se mettre en situation de renforcement de l'activité ostéoclastique (déficience hormonale, déficience

calcique, immobilisation), ou au contraire exacerber la formation osseuse (supplémentation en glucocorticoïdes par exemple).

L'ovariectomie est généralement pratiquée afin de simuler la chute d'œstrogènes au moment de la ménopause. En effet, les modèles murins ne présentant pas de dégénérescence osseuse naturelle, elle doit être provoquée chez les animaux.

L'ablation des ovaires provoque une chute soudaine des hormones stéroïdes de l'organisme, entraînant une dérégulation du métabolisme osseux, ayant pour conséquence la perte de densité osseuse. Les témoins seront opérés, c'est-à-dire qu'ils vont suivre le protocole de chirurgie des animaux subissant l'ovariectomie, mais l'ablation des gonades ne sera pas effectuée (SHAM).

Les modifications de l'os liées à l'âge peuvent être étudiées en utilisant un modèle de souris présentant un vieillissement accéléré. Une ostéoporose a été détectée chez les souris SAM-R/3 et parmi celles-ci un groupe, SAM-P/6 avec une ostéoporose plus grave pouvant constituer un modèle murin de l'ostéoporose sénile.

1.1.3 Paramètres étudiés

Dans le dépistage de l'ostéoporose, deux techniques sont essentiellement utilisées : l'évaluation des marqueurs du remodelage osseux et la mesure de la densité minérale osseuse.

1.1.3.a : Mesure de la densité minérale osseuse

L'OMS a proposé une définition de l'ostéoporose basée sur le t-score, c'est-à-dire l'écart à la moyenne entre la valeur mesurée pour la DMO du patient et la valeur moyenne de la DMO d'un jeune adulte du même sexe (valeur de référence).

L'OMS a proposé de classer l'échelle de la diminution de la masse osseuse en quatre niveaux :

Niveau 1 : *masse osseuse « normale »*, la DMO diffère de moins d'un écart-type de la moyenne de référence (T score supérieur à -1),

Niveau 2 : *masse osseuse faible* (ostéopénie), T score compris entre -1 et -2,5,

Niveau 3 : *ostéoporose*, T score inférieur à -2,5,

Niveau 4 : *ostéoporose grave*, l'ostéoporose est d'autant plus grave, et le risque fracturaire plus grand, que le T score diminue au-delà de -2,5.

Il existe une corrélation entre la baisse de la densité minérale osseuse et l'augmentation du risque de fracture.

Deux techniques sont utilisées :

Ultrasons , c'est une technique bon marché mais peu précise

Ostéodensitométrie ou Absorptiométrie biphotonique, qui constitue la méthode de référence.

Il est donc essentiel de mesurer la DMO dans nos travaux. Pour cela, nous avons utilisé la technique d'absorptiométrie biphotonique en utilisant un PIXIMUS, appareil adapté aux animaux de petites tailles.

1.1.3.b : Marqueurs du remodelage osseux

Ils ont été récemment évalués sous l'égide de la Société française de biologie clinique et s'avèrent efficaces pour le suivi des traitements de l'ostéoporose mais ne constituent pas une méthode de dépistage de la maladie. En effet, ils permettent un suivi non invasif et plus précoce que la DMO des changements du métabolisme osseux : les variations des marqueurs osseux apparaissent au bout d'un à deux mois de traitement, tandis qu'il faut une période beaucoup plus longue pour pouvoir observer l'impact d'un traitement sur la DMO.

- Marqueurs de la formation osseuse

Les principaux marqueurs sont la phosphatase alcaline et la présence d'ostéocalcines, propeptides du collagène de type I

L'évaluation de l'activité de la phosphatase alcaline (PA) est le marqueur le plus utilisé de la formation osseuse. Son activité augmente naturellement chez la femme après la ménopause. Il existe quatre iso-enzymes de la PA, soit : la osseuse, l'hépatique, l'intestinale et la rénale. Cependant, il existe des isoenzymes spécifiques de PA osseuse.

L'ostéocalcine est une protéine de petite taille, synthétisée par les ostéoblastes et spécifique du tissu osseux. Elle augmente naturellement chez les patients après la puberté. La partie non incorporée dans la matrice extra cellulaire est présente dans le sérum sous forme circulante libre et peut être utilisée comme témoin de la formation osseuse.

Les propeptides d'extension N-terminal ou C-terminal (PINP et PICP) reflètent la synthèse de collagène au niveau de la matrice osseuse, mais aussi au niveau d'autres tissus.

- Marqueurs de la résorption osseuse

Les marqueurs les plus sensibles sont les dosages des molécules de pontage du collagène (pyridinoline et désoxypyridinoline) et de leurs peptides associés (CTX, NTX urinaire). En effet, les molécules de collagène de type I sont liées entre elles par des molécules de pontage, la pyridinoline et la désoxypyridinoline, au niveau des télopeptides amino et carboxy terminaux. Elles assurent la stabilité de la fibre de collagène au sein de la matrice osseuse. Au cours de la résorption ostéoclastique de la

matrice osseuse, ces molécules de pontage sont libérées dans la circulation. La molécule de pyridoline possède un groupe hydroxyle supplémentaire par rapport à la désoxypyridoline.

Le dosage du calcium urinaire permet un suivi simple, mais peu sensible, de la résorption osseuse. L'hydroxyproline est libérée lors de la dégradation du collagène de la matrice et ne peut pas être réutilisée pour la synthèse. L'hydroxyprolinurie témoigne donc de la résorption osseuse, mais constitue un marqueur non spécifique, puisqu'elle peut provenir d'autres tissus que le tissu osseux. L'acide phosphatase tartrate résistant (TRAP) peut aussi être utilisée mais est non spécifique de la résorption osseuse.

Dans le cadre de nos travaux, nous avons utilisé la Phosphatase Alcaline comme marqueur de formation osseuse et le CTX comme marqueur de résorption.

1.1.3.c : microarchitecture

De nombreuses études ont montré une corrélation entre la perte de densité de masse osseuse et l'incidence de fracture ostéoporotique. Cette donnée reste donc un élément majeur pour diagnostiquer l'ostéoporose et un éventuel risque de fracture. Cependant, d'autres éléments de la composition du squelette influencent la résistance osseuse, comme la macro et la micro architecture. Notons que le test de densité osseuse mesure la densité de l'os mais ne nous donne aucune indication sur la microarchitecture osseuse. Pourtant l'évaluation de la densité comme celle de la qualité de l'architecture de l'os est nécessaire pour un diagnostic fiable de l'ostéoporose (Ammann et Rizzoli, 2003). Plusieurs paramètres biomécaniques peuvent être utilisés pour évaluer la qualité de l'os et donc sa résistance à la fracture. Les données extrinsèques de l'os représentent ses caractéristiques globales (géométrie, structure). Les données intrinsèques nous renseignent sur la qualité du matériau osseux.

Le degré de minéralisation de la matrice ainsi que la caractérisation des cristaux sont aussi des facteurs déterminants.

- Propriétés extrinsèques et intrinsèques de l'os

D'un point de vue biomécanique, les fractures représentent un défaut structural de l'os. La capacité de résistance à la fracture d'un os dépend de la quantité de tissu osseux, de la distribution spatiale de la masse osseuse, et des propriétés intrinsèques du matériau osseux. Le comportement du matériau osseux varie en fonction de la nature des charges appliquées (figure 10).

Le remodelage osseux est le procédé biologique qui contrôle le changement des caractéristiques qui influent sur la résistance osseuse. L'os est capable de s'adapter à son environnement mécanique et hormonal, et est capable de s'auto-réparer. Il est en renouvellement continu et auto-adaptation. En effet, des travaux (Jones et al., 1977) ont montré une augmentation de la taille des os du bras

dominant versus bras non dominant des joueurs de tennis. L'os peut également changer de structure géométrique par rapport à des changements délétères des propriétés de sa matrice osseuse (Bonadio et al., 1993). La perte de résistance due à l'âge reflète la réponse du squelette face aux changements hormonaux et mécaniques de son environnement.

Il est important de dissocier les propriétés du matériau osseux et les propriétés de sa structure. La réponse de l'os à d'éventuelles déformations secondaires aux forces appliquées caractérise ses propriétés structurelles, aussi appelées propriétés extrinsèques. Ces propriétés structurelles dépendent de la taille et de la géométrie des os, mais aussi des propriétés du tissu osseux. Les propriétés du matériau sont indépendantes de la géométrie de l'os et reflètent les propriétés intrinsèques de l'os cortical ou trabéculaire. Pour évaluer l'effet d'une maladie ou d'une thérapie sur l'os, ces deux paramètres doivent être pris en compte.

Au niveau des paramètres géométriques, le premier facteur à prendre en compte est la taille de l'os (Seeman et al., 2001 ; Skaggs et al., 2001; Ahlberg, 2003 ; Lochmuller et al., 2002). En effet, les os les plus gros sont les plus résistants.

De plus, pour une meilleure résistance aux forces appliquées à l'os (forces de compression, de torsion ou de flexion), le matériau osseux est distribué loin de l'axe neutre de flexion, en général situé au centre de l'os. La distribution de cette masse autour de cet axe est appelée moment d'inertie. Pour une forme cylindrique, le moment d'inertie est proportionnel au diamètre à la puissance 4 : donc pour l'os, une augmentation faible du diamètre osseux peut influencer de manière importante sa résistance à la fracture.

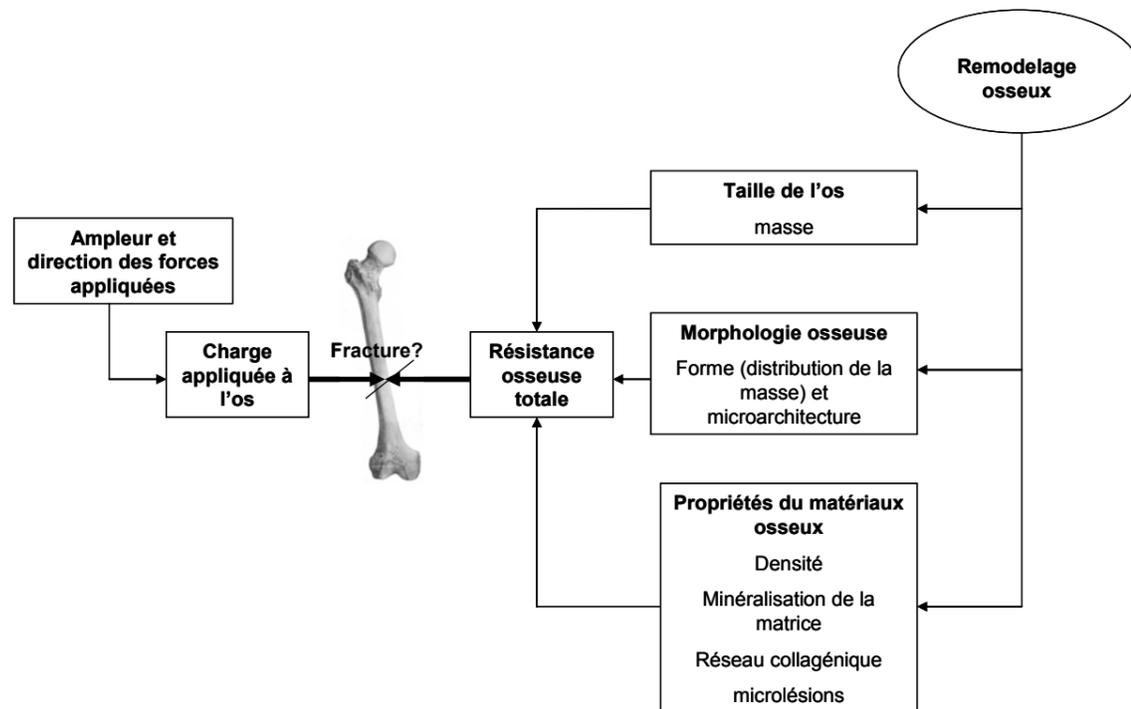


Figure 10: Synthèse des paramètres intervenant dans le risque de fracture

1.1.3.d : Evaluation des paramètres biomécaniques de l'os

- Test flexion trois points : connaissances actuelles

Pour les petits animaux comme les rongeurs, les essais de flexion sont principalement utilisés. En effet, il est difficile d'effectuer sur ces modèles des essais de compression ou de traction, plus largement utilisés sur des os plus gros. Plusieurs tests de flexion peuvent être effectués, les tests de flexion trois points restant le plus couramment utilisés. En test de flexion, le matériau osseux subit à la fois des forces de compression et de traction.

- Présentation du test

L'os est posé sur deux supports placés perpendiculairement à l'axe horizontal et on applique une force au milieu de ces supports perpendiculairement à l'axe osseux. Le matériau subit la force jusqu'à la

fracture. Pendant l'essai, les données en force et en déplacement sont enregistrées et les propriétés mécaniques sont calculées à partir des données enregistrées et de la géométrie de l'os. Le test de flexion trois points ne nécessite pas de préparation préalable des échantillons.

- Paramètres géométriques

La figure 11 représente une coupe transversale d'un os.

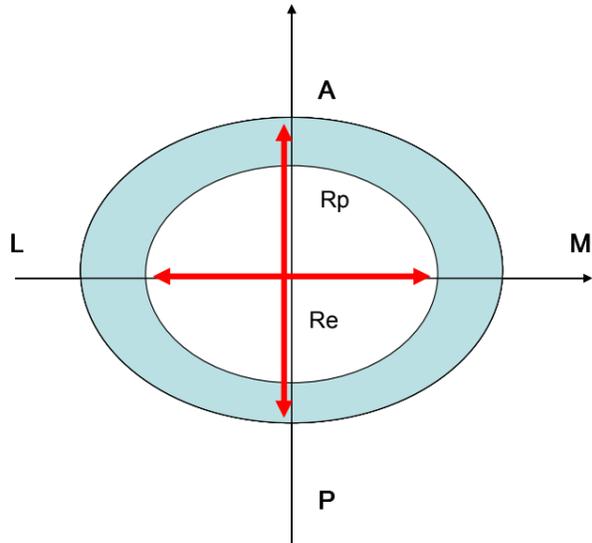


Figure 11 : Coupe transversale d'un os

L'os étant schématisé par un tube cylindrique, les données géométriques importantes sont le rayon périostéal (ou rayon extérieur), le rayon endoostéal (ou rayon intérieur) et la taille de l'échantillon. Ces données nous permettent de calculer le moment d'inertie I de l'os, qui représente son homogénéité autour de l'axe central.

$$I = \pi / 4 (rp^4 - re^4)$$

Avec :

rp : rayon périostéal

re : rayon endoostéal

La résistance à la cassure d'un os est dépendante de son homogénéité : une homogénéité élevée est corrélée avec une résistance à la cassure plus élevée. En moyenne chez les mammifères, $r_p = 1,8 r_e$, ou $I = 0,71 r_p^4$.

Le rayon périostéal est donc important pour la rigidité osseuse : plus le diamètre extérieur de l'os est élevé, plus forte sera son inertie. Pour élever la résistance à la cassure d'un os, il est donc plus intéressant de faire évoluer son diamètre extérieur.

- Force et déplacement ou paramètres extrinsèques

Les paramètres extrinsèques de l'os sont dépendants de sa géométrie et de sa structure, et sont définis par la relation entre la force appliquée sur l'os et le déplacement subi par celui-ci. En effet, l'os de longueur L soumis à une force verticale F subit un déplacement d . La relation entre la force appliquée et le déplacement donne la courbe Force appliquée - déplacement (exprimé respectivement en N et en m), qui nous permet de définir les propriétés plastique et élastique des os. (figure 12)

La partie linéaire de la courbe correspond au déplacement élastique, c'est-à-dire que l'os reprend sa configuration initiale lorsque la force n'est plus appliquée. La rigidité R (en $N\ m^{-1}$) de l'os correspond à la pente de cette partie linéaire. Elle est dépendante de la minéralisation osseuse.

A partir d'un certain déplacement, la courbe n'est plus linéaire. C'est la zone où l'os a un comportement plastique, c'est-à-dire qu'il ne reprend plus sa configuration initiale lorsque la force n'est plus appliquée et garde un déplacement irréversible. Le déplacement conservé est appelé déplacement résiduel.

F_{max} définit la force ultime ou force de cassure pouvant être appliquée à l'os, à partir de laquelle l'os ne supporte plus le déplacement et se rompt. F_{max} correspond donc à la résistance à la cassure de l'os. Le déplacement associé est appelé déplacement ultime (D_u). L'aire sous la courbe jusqu'au point de rupture représente le travail nécessaire à la rupture de l'os (W).

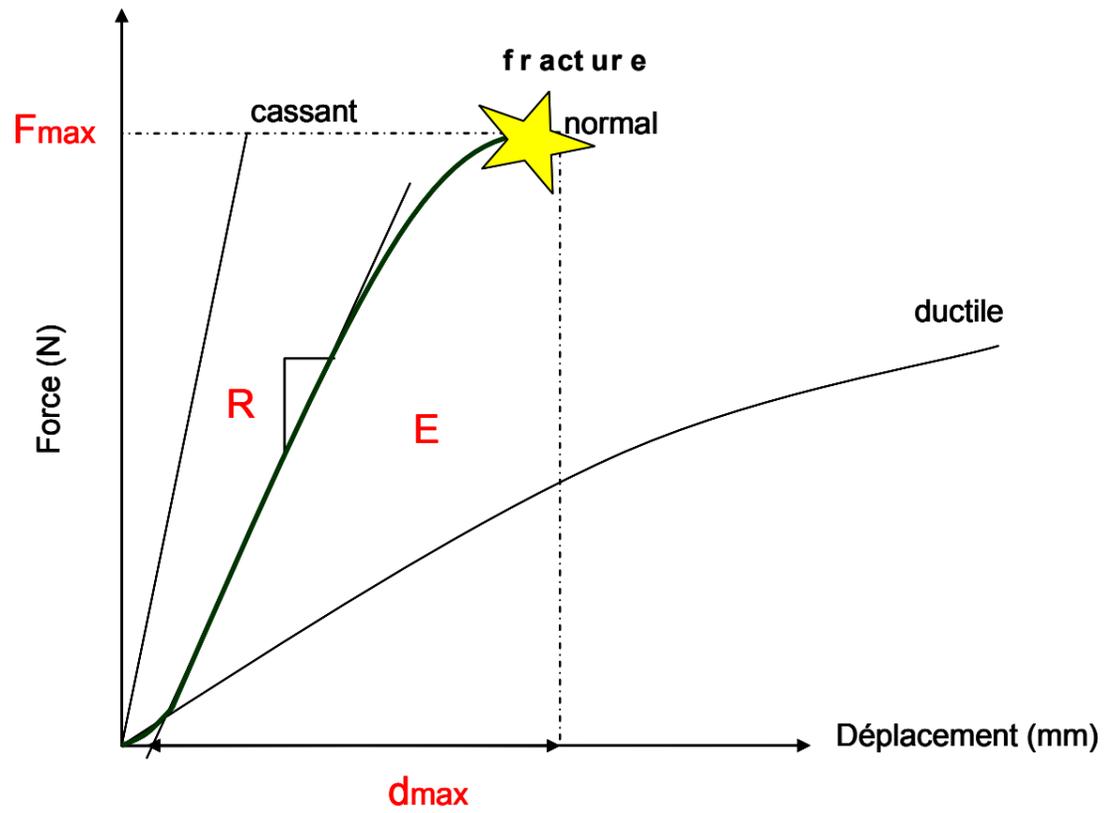


Figure 12 : Courbe caractéristique d'une réponse force-déplacement

- Contrainte et déformation ou paramètres intrinsèques

Les données extrinsèques caractérisent un os de façon globale, mais sont dépendantes de sa géométrie et de sa structure. Pour connaître la qualité intrinsèque d'un matériau, ce biais doit être supprimé. Pour ce faire, on établit la courbe (figure 13), représentant la contrainte appliquée (σ) en fonction de la déformation (ϵ). Ces paramètres sont établis à partir des données extrinsèques normalisées par rapport à la géométrie du matériau.

Dans ce modèle, la charge est donc rapportée à la dimension du matériau testé et est convertie en contrainte.

La contrainte, notée σ (en N/m^2 ou Pa), correspond à la force appliquée sur le matériau par unité de surface.

$$\sigma = F (3 L / 2 w t^2)$$

Avec

F : force appliquée (N)

L : longueur (m)

w : largeur (m)

t : épaisseur (m)

La déformation, notée ε , correspond au déplacement produit sous la contrainte.

$$\varepsilon = d (6 t / L^2)$$

Avec

d : déplacement (m)

t : épaisseur (m)

L : longueur (m)

La courbe contrainte par rapport au déplacement présente une partie linéaire (zone élastique) et non linéaire (zone plastique).

La contrainte maximale conduisant à la rupture de l'os est appelée σ_{\max} et correspond à la résistance du matériau.

Le « yield point », ou limite élastique, se situe à la limite des zones élastiques et plastiques, et donc situé sur la courbe au point où elle cesse d'être linéaire.

La rigidité correspond à la pente de la droite qui décrit le déplacement en fonction de la force.

L'aire sous la courbe représente l'énergie nécessaire à la rupture de l'os : W. Les traumatismes transfèrent de l'énergie à l'os, et si l'énergie est supérieure à la quantité que l'os peut absorber, l'os casse.

Le module de Young ou module d'élasticité correspond à la pente de la partie linéaire de la courbe de la contrainte en fonction de la déformation. Un module de Young fort témoigne d'un matériau rigide, et un module de Young faible d'un matériau élastique. Il est régi par la loi de Hooke.

$$\sigma = E . \varepsilon$$

Avec

σ : contrainte appliquée (Pa)
E : module d'élasticité de Young (Pa)
 ε : déformation (sans dimension)

Un matériau osseux hautement minéralisé sera plus résistant à la cassure mais aussi moins élastique, plus rigide et plus friable qu'un matériau osseux riche en collagène.

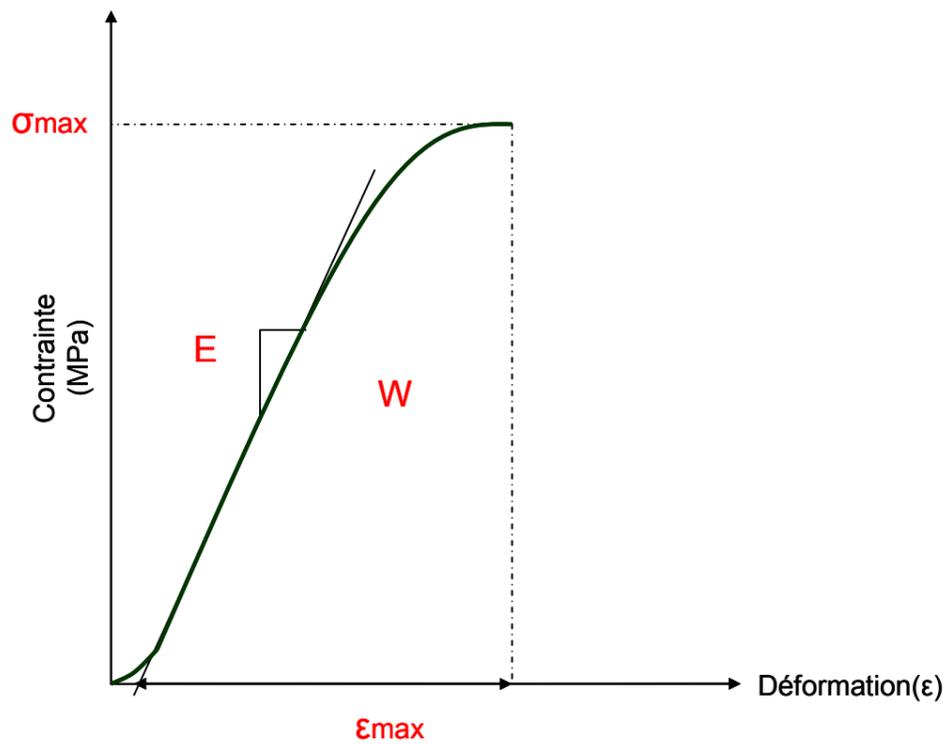


Figure 13 : Courbe caractéristique d'une réponse Contrainte - déformation

- Viscoélasticité du tissu osseux

L'os est un matériau viscoélastique, c'est-à-dire qu'une force d'intensité identique appliquée sur l'os avec une vitesse différente induira une déformation osseuse différente.

La vitesse de déformation obtenue est définie en fonction de la déformation et de la durée d'application de la force.

$$V = \varepsilon / t$$

Avec

V : vitesse de déformation (s^{-1})

ε : déformation occasionnée par l'application de la force (sans dimension)

t : temps (s)

Ainsi, pour une contrainte identique, la déformation de l'os est plus importante à vitesse élevée qu'à vitesse faible. Lorsque la vitesse de déformation est élevée, l'os est plus raide, ce qui correspond à un module de Young plus fort.

1.2 : Protocole expérimental

1.2.1 : Animaux et régimes

Pour la première étude, la chirurgie s'effectue sous anesthésie (100 mg/kg de kétamine et 10 mg/kg de xylazine) à 12 ou 24 semaines. 1 semaine après l'opération, les souris sont divisées par groupes d'études (OVX témoin, SHAM témoin, OVX nourries avec 10 ou 25 g/kg de collagène hydrolysé). Il y a 8 souris par groupes. Elles ont été nourries pendant 12 ou 24 semaines avec un régime (AIN-93M contenant 240 g/kg de protéine de soja sans isoflavones comme protéine source) supplémenté avec 10 ou 25 g/kg de collagène hydrolysé. Une évaluation succincte de la prise alimentaire des souris nous a indiqué une moyenne de 3,5 g/jour, ce qui nous permet d'évaluer la consommation d'une souris quotidienne de 1g/kg de masse corporelle pour les souris ingérant le régime supplémenté par 10g/kg de régime et à 2,5 g/kg de masse corporelle pour les souris ingérant le régime supplémenté par 25 g/kg de régime. 12 ou 24 semaines après la chirurgie, les animaux ont été sacrifiés et disséqués. La composition corporelle a été étudiée.

Pour la seconde étude, la chirurgie s'effectue sous anesthésie (100 mg/kg de kétamine et 10 mg/kg de xylazine) à 12 semaines d'âge. Elles ont été nourries pendant 12 ou 16 semaines avec un régime (AIN-93M contenant 120 g/kg de caséine comme protéine source) supplémenté ou non avec 25 g/kg de collagène hydrolysé. En effet, un groupe de souris a commencé sa supplémentation *ad libitum* en collagène hydrolysé 4 semaines avant l'ovariectomie (pOVX25). L'apport en collagène hydrolysé a été réalisé *ad libitum* (OVX25) ou par gavage (gOVX25). Un groupe a été gavé à l'eau comme témoin du gavage. Un groupe supplémenté en raloxifène (1mg/kg de régime) a été utilisé comme témoin positif. 12 semaines après la chirurgie, les animaux ont été sacrifiés et disséqués. La composition corporelle a été étudiée.

1.2.2 : Paramètres mesurés



Photo 1 : Mesure de DMO sur piximus

- **La densité de masse osseuse (BMD)** a été déterminée une fois par mois pendant 12 ou 24 semaines, par DXA à l'aide d'un Piximus (GE Medical Systems, software version 1.4 X lunar).

- **Les marqueurs du métabolisme osseux (CTX, PA)** ont été quantifiés sur prélèvements péri-orbitaux sanguins à 4 et 12 ou 24 semaines.

Le CTX a été mesuré à l'aide du kit ELISA RatLaps™ kit (Osteomedical) et la PA par marquage fluorométrique au Nitrophenylphosphate.

- **Composition osseuse, géométrie et propriétés biomécaniques des fémurs.** L'étude des propriétés biomécaniques des fémurs a été effectuée avec un test de flexion 3 points (Instron 4501, Instron, Canton, MA, USA). La composition minérale a été étudiée par analyse des cendres à l'aide d'un spectrophotomètre Zeeman. La géométrie du fémur a été scannée à diaphyse à l'aide d'un microtomographe (μ CT, Skyscan 1072, Skyscan, Kontich, Belgium).

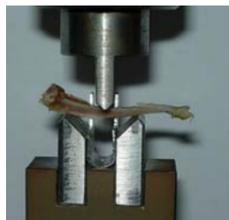


Photo 2 : test de flexion trois points sur fémurs de rat

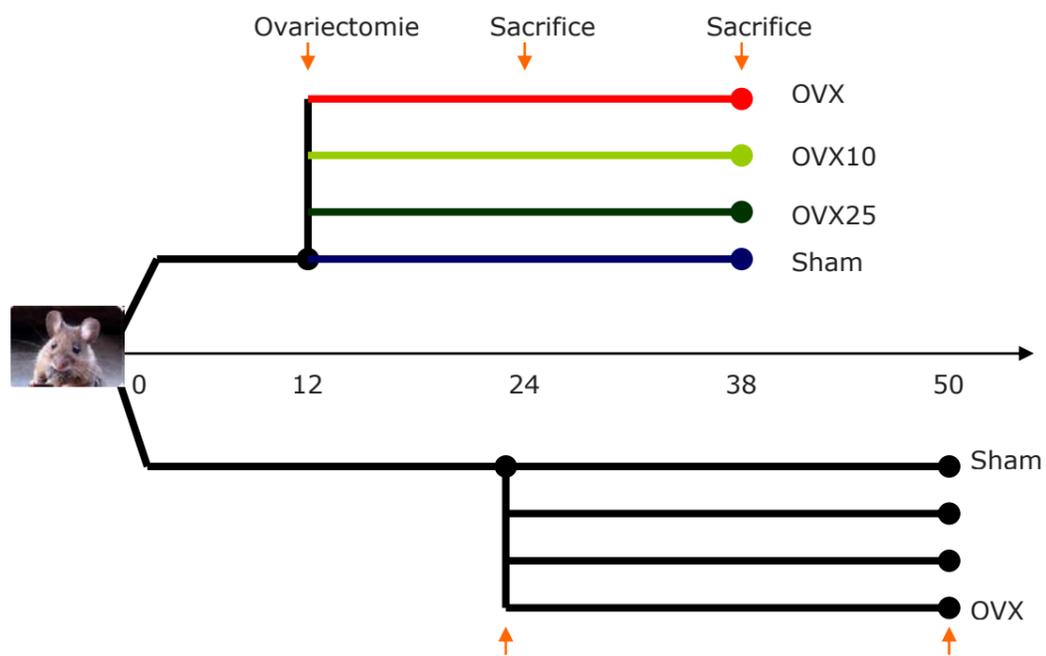


Figure 14 : Plan expérimental de la première étude in vivo

Ingredient g/ kg diet	Contrôle	OVX10	OVX25
Protéine de soja	200,2	190,2	175,2
PCH a	0	10	25
Amidon de maïs b	569,2	569,2	569,2
saccharose c	91,7	91,7	91,7
Huile de soja d	40	40	40
AIN 93 M minéraux	35	35	35
AIN 93 M vitamines	10	10	10
Alpha-cellulose f	50,1	50,1	50,1
choline f	2,3	2,3	2,3
méthionine f	1	1	1
cystéine f	0,4	0,4	0,4

Figure 15 : Tableau de composition des régimes de la première étude in vivo

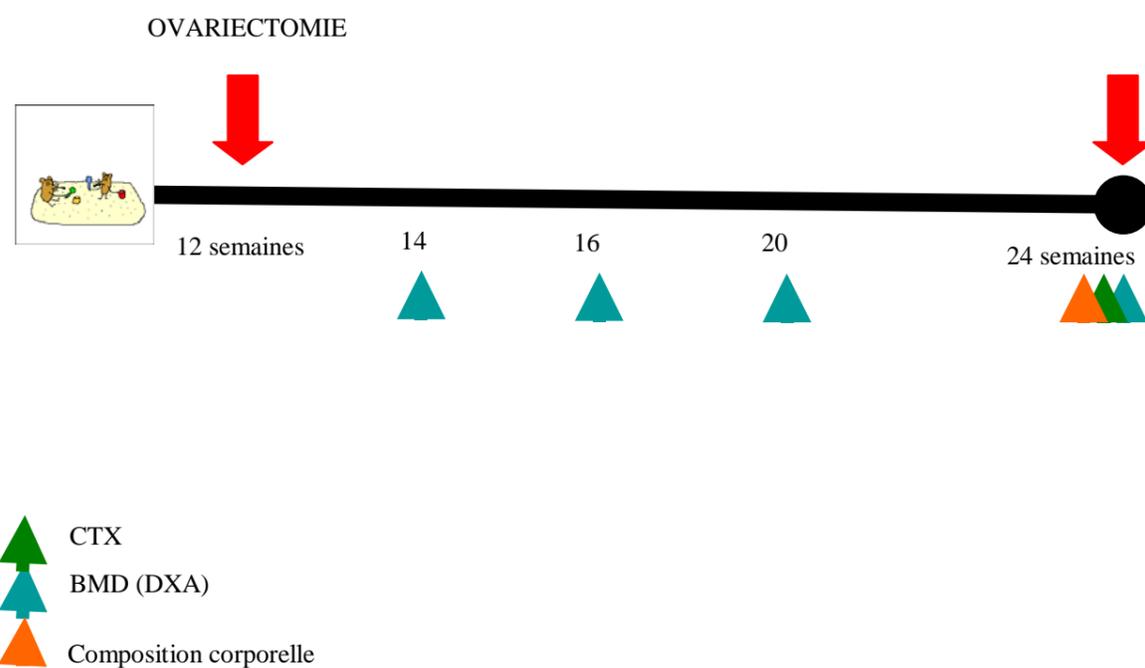


Figure 16 : Plan de la seconde étude in vivo

Ingredient g/ kg diet	Control	OVX25c
Caséine	120	95
PCH a	0	25
Amidon de maïs b	639.6	639.6
saccharose c	103.1	103.1
Huile de soja d	40	40
AIN 93 M minéraux e	12,5	12,5
AIN 93 M vitamine e	10	10
Cellulose f	50.1	50.1
Choline f	2.3	2.3
Méthionine f	1	1
Cystéine f	0.4	0.4

Figure 17: composition des régimes de la seconde étude in vivo

2.1 : Modèle *in vitro*

Les modèles cellulaires nous permettent d'étudier les mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans le métabolisme osseux et de comprendre les facteurs le modulant.

2.1.1 Généralités

Les facteurs à prendre en compte pour la mise en culture sont l'origine du prélèvement cellulaire et la mise en place de la technique de culture (surface, médium, additifs utilisés) qui doivent être standardisés pour assurer la reproductibilité des expériences. Le choix de la matrice doit tenir compte de sa biocompatibilité et doit promouvoir la prolifération et la différenciation cellulaire. Il doit assurer au maximum le respect de la morphologie cellulaire, l'adhésion et l'organisation du cytosquelette, qui influencent l'expression génique des cellules et leur activité. Les surfaces généralement utilisées sont en polystyrène qui permet la culture en monocouche des cellules. La topographie elle-même de la surface est importante puisqu'elle influence l'adhésion cellulaire et l'alignement des fibres de collagène (rainures, micromotifs, rugosité). La composition minérale (en Ca/P, Ca/mg), de l'oxygénation, du pH et du médium est standardisée.

Les cellules utilisées dans les cultures peuvent être obtenues par prélèvement direct de l'organe, de tumeurs ou par lignées immortalisées. Les cultures d'organes ont l'avantage de permettre l'évaluation directe de la formation / résorption osseuse, l'intégrité de l'organe est préservée, et la culture est peu sensible aux variations extérieures. Les cultures peuvent être établies à partir des précurseurs cellulaires, par mise en culture des cellules progénitrices des cellules osseuses (cellules stromales, BMSCs) qui constitue une méthode standard pour l'étude de la régulation d'un agent sur le métabolisme osseux, ou par mise en culture des cellules prélevées sur organes (cultures primaires). Les lignées cellulaires immortalisées ont l'avantage d'assurer la reproductibilité du phénotype cellulaire dans les mêmes situations de culture. Ces cultures sont donc très intéressantes pour l'étude des effets de modifications génétiques ou chimiques.

2.1.2 : Etude de la biologie des ostéoclastes et ostéoblastes

Deux types de modèles sont intéressants puisque les cellules ostéoclastiques sont des cellules que nous retrouvons sous deux états dans l'os, soit la forme inactive préostéoclastique soit les cellules actives capables de résorber l'os, les ostéoclastes.

Deux types de modèles de cellules pré-ostéoclastiques ont été mis au point, la culture primaire et les lignées de cellules immortalisées

Cependant, pour l'étude d'ostéoclastes matures qui sont des cellules non prolifératives bien différenciées, des cultures primaires doivent être réalisées. Elles sont obtenues à partir de cellules pré-osteoblastiques hématopoïétiques où les ostéoclastes sont isolés directement à partir des os. Le défi est de garder un phénotype normal pour les ostéoblastes, c'est-à-dire d'obtenir une phase de prolifération cellulaire suivie d'une différenciation après confluence.

- Culture primaire

Deux sources sont possibles pour obtenir les progéniteurs : la moelle osseuse, puisque les ostéoclastes sont issus des cellules stromales, et les PBMCs (Peripheral blood mononuclear cells) (Fujikawa et al., 1996).

Pour une culture à partir des progéniteurs de la moelle osseuse, il est nécessaire d'introduire CSF-1 qui induit la différenciation ostéoclastique, la vitamine D et la PTH, qui influence l'expression de RANKL.

Plus récemment, des études (Fujikawa et al., 1996 ; Flanagan et al., 1998) ont montré que les PBMCs mis en culture en présence de CSF-1, de la vitamine D et de RANKL, pouvaient se différencier en ostéoclastes. L'ancien modèle cellulaire nécessitait aussi l'ajout de glucocorticoïdes, tandis que les modèles récents ne nécessitent plus que CSF-1, et RANKL (un composant RANKL synthétique soluble).

Ces cultures sont utilisées pour l'étude du système RANK/RANKL/OPG, et des interactions générales entre les ostéoclastes et les BMSCs. Ainsi, une étude, (Neale et al., 2000), a démontré que les progéniteurs ostéoclastiques issus des PBMCs provenant de patients atteints de la maladie de Paget avaient une sensibilité exacerbée à la vitamine D et au RANKL.

La culture primaire des ostéoblastes se fait par mise en culture des BMSCs, prélevées chez la souris, le rat, le lapin ou la moelle osseuse humaine (Hughes and Aubin, 1998).

L'intérêt principal de cette culture vient du fait que les BMSCs peuvent être aussi différenciées en adipocytes, mais aussi en myocytes, chondrocytes et ténocytes.

La différenciation de ces cellules en ostéoblastes nécessite la présence de glucocorticoïdes, nécessaire à la phase de minéralisation ostéoblastique.

Nos études ont été effectuées sur des cultures primaires d'ostéoblastes et d'ostéoclastes de souris, ce qui permet une régulation et une auto-régulation de ces deux types cellulaires et une observation plus physiologique de ce phénomène.

- Lignées de cellules immortalisées

La lignée RAW est utilisée pour l'étude de la régulation hormonale jouant dans la différenciation

ostéoclastique. Ces cellules expriment les récepteurs aux oestrogènes et sont donc largement utilisées pour l'étude des oestrogènes et des SERMs sur l'activité et la différenciation des ostéoclastes.

Les lignées H-AK^btsA58, bcl-X_L/Tag et TMC16 sont issues de la mise en culture de la moelle de souris transgéniques, ce qui permet le contrôle de gènes cibles. Les cellules de la souche TEO, dont les précurseurs ostéoclastiques ont été mis en présence du rétrovirus qui encode pour la forme négative de RANKL, sont indépendantes du facteur RANKL pour effectuer leurs différenciations. Enfin, la lignée FLG 29.1 a été établie à partir de la moelle osseuse d'une patiente atteinte de leucémie.

Les principales lignées immortalisées non humaines sont : la lignée imBMS-B, obtenues à partir des souris transgéniques H-2K^b-tsA58, dont la différenciation des précurseurs en ostéoblastes ou ostéoclastes est dépendante de la température ; la lignée MS1, obtenue à partir de souris knockout hétérozygotes pour PTHR1 (récepteur à PTH1), qui permet l'étude des mécanismes de régulation de PTH ; et la lignée UAMS-33, obtenue à partir de cultures de la moelle osseuse de SAMR1. La particularité des précurseurs de cette dernière lignée vient du fait qu'ils sont capables de se différencier en adipocytes ou en ostéoblastes. Elle est donc largement utilisée pour comprendre les mécanismes et interrelations des adipocytes et des ostéoblastes. Par exemple, elle a servi à l'étude de l'activation de la voie adipocyte par PPAR- α 1 (Nuttall and Gimble, 2000).

Les lignées de cellules humaines TF274, HERKO, F1STRO.1⁺ et OPC1 ont été obtenues à partir de l'antigène T SV40. La lignée HERKO a été obtenue à partir d'une patiente présentant une mutation sur ses récepteurs oestrogéniques, et est donc utilisée pour l'étude de la régulation oestrogénique. Enfin, les cellules immortalisées humaines de la lignée hOP7-hMS ont gardé la capacité de se différencier en adipocytes ou en ostéoblastes, et sont aussi utilisées pour l'étude de la régulation hormonale de l'ostéoclastogénèse, notamment la voie RANKL/OPG.

Notons qu'il existe aussi des lignées de cellules immortalisées pour l'étude des ostéocytes : MLO-Y4, HOB-01-C1 et HOB-OS-T1.

- Modèles cellules matures

Les cellules en culture sont non-prolifératives, différenciées, et proviennent de la mise en culture de précurseurs dans les conditions nécessaires pour obtenir leur différenciation en ostéoclastes, ou isolées à partir des os prélevés chez les animaux.

Ces cultures sont établies à partir de fœtus ou d'os adultes de poulets, de rongeurs et d'humains. Ces cultures ont l'avantage de présenter des ostéoblastes aux phénotypes normaux, c'est-à-dire présentant deux phases distinctes de prolifération et de différenciation.

Les cultures établies à partir de tumeurs ostéoblastiques sont immortalisées et clonables, mais perdent

l'avantage cité précédemment.

Dans le cadre de nos travaux, nous avons utilisé des cultures primaires mises au point au sein du laboratoire, obtenues à partir de la moelle osseuse de souris afin de réaliser nos expériences. Ce choix porté sur une volonté de se rapprocher des conditions physiologiques de croissance cellulaire osseuse.

2.2. Protocole expérimental

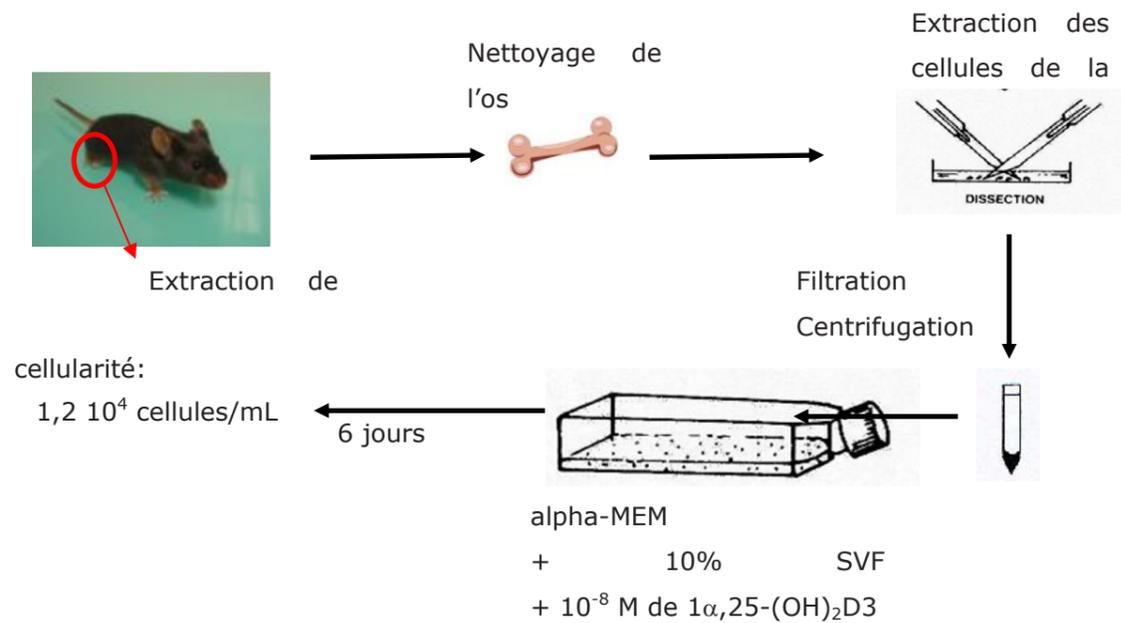


Figure 18 : Protocole de la culture cellulaire primaire

- Les cultures cellulaires primaires ont été établies à partir de la moelle osseuse de tibias ou de fémurs issus de souris Balb/c à 4 semaines d'âge. La croissance et la différenciation des cellules osseuses ont été étudiées à plusieurs concentrations de collagène hydrolysé (de 0,2 à 1,0 mg/mL). Les hydrolysats sont de plusieurs origines (porcins, bovins, piscicoles) et ont plusieurs poids moléculaires (2000 et 5000 Da). La protéine témoin utilisée est la BSA.

- La croissance des ostéoblastes et des ostéoclastes ont été mesurées après 14 semaines de culture par fluorométrie à l'aide du kit FluoReporter® Blue Fluorometric dsDNA Quantitation Kit (Molecular Probes). Des observations microscopiques ont été réalisées grâce à des coloration Giemsa. (Sigma).

- La différenciation ostéoblastique a été évaluée par dosage de l'activité de la phosphatase alcaline.

- Ostéoclastes : La résorption osseuse due à l'activité ostéoclastique a été mesurée par puits assays avec le kit BD BioCoat™ Osteologic™ bone cell culture system (BD Bioscience) après 14 jours de culture. L'observation de la digestion du film de culture a été effectuée au microscope.

RÉSULTATS DE NOS ÉTUDES

1. Effect of ingested hydrolyzed collagen on bone metabolism and biomechanical parameters

Fanny Guillerminet^{1,2}, Hélène Beaupied³, Véronique Fabien-Soulé⁴, Daniel Tomé^{1,2}, Anne Blais^{1,2}

¹INRA, UMR914 Nutrition physiology and Ingestive Behavior, F-75005 Paris, France ²AgroParisTech, UMR914 Nutrition physiology and Ingestive Behavior, F-75005 Paris, France

³Inserm U658, CHR Orléans, France

⁴Rousselot SAS, 10 avenue de l'Arche, F-92419 Courbevoie, France

L'objectif de cet article a été de démontrer l'effet des hydrolysats de collagène sur le métabolisme osseux *in vitro* sur cultures cellulaires primaires et *in vivo* sur un modèle de souris C3H/HeN ovariectomisées.

Nous avons choisi d'utiliser un modèle de culture mixte développé au laboratoire de Physiologie de la Nutrition et du Comportement Alimentaire de l'INRA/INA PG.

Des études préliminaires ont été réalisées afin de caractériser et mettre en place notre modèle *in vitro* (voir Annexes). Des pré-cultures ont été établies à partir du tibia, fémur, tibia + fémur ou humérus obtenus de souris de souches C3H ou Balb/c. L'activité de la phosphatase alcaline a été mesurée par cinétique enzymatique à différents temps (7 jours ou 14 jours) pour différentes doses de collagène hydrolysé. La protéine témoin utilisée est l'Albumine de Sérum Bovin (BSA). Nos résultats montrent que la présence de collagène hydrolysé d'origine porcine (P), bovine (R) ou de poisson (F) de masse moléculaire de 3 000 Da dans le milieu de culture a peu d'effet sur la croissance cellulaire mais entraîne une augmentation de l'activité de la phosphatase alcaline par rapport à la culture témoin. Les doses étudiées sont de 1 mg/mL, 0,1 mg/mL et 0,001 mg/mL. Pour les protéines P et R de poids moléculaire de 3 000 Da, l'activité de la phosphatase alcaline est 2 à 3 fois plus importante que pour la culture témoin. Ce résultat est confirmé par les études microscopiques qui mettent en évidence une plus grande différenciation des ostéoblastes. Nous observons un effet dose dépendant de la présence d'hydrolysat de collagène sur l'activité de la phosphatase alcaline.

Nous obtenons des différences de phosphatase alcaline moins importantes mais cependant toujours significatives ($p < 0,05\%$) lorsque nous menons les études sur des cultures mixtes de cellules murines de type C3H.

Ce travail a pour but d'étudier les effets d'un apport de collagène hydrolysé par voie alimentaire sur la perte de densité osseuse au cours de la ménopause.

L'étude *in vivo* a été menée sur 32 souris C3H/HeN. A 12 semaines, 24 souris ont subi une ovariectomie, et 8 ont été sham-opérées. Nous avons étudié le métabolisme osseux et les propriétés biomécaniques des os de souris recevant des régimes complétés en collagène hydrolysé. Trois protocoles différents ont été mis en place:

- souris ayant subi une ovariectomie à 12 semaines, sacrifice à 3 mois post opération,
- souris ayant subi une ovariectomie à 12 semaines, sacrifice à 6 mois post opération,
- souris ayant subi une ovariectomie à 6 mois, sacrifice à 6 mois post opération.

Nos résultats montrent que les souris ayant subi une ovariectomie recevant 2,5 % de collagène hydrolysé ont une DMO plus élevée par rapport aux souris témoins (ayant subi une ovariectomie mais ne recevant pas de collagène hydrolysé). Au niveau des facteurs de résorption osseuse, on constate une diminution significative du CTX plasmatique pour les souris recevant du collagène hydrolysé (dose = 1% ou 2,5%) par rapport aux souris témoins.

Finalement, il y a une augmentation significative de la résistance à la cassure de l'os, dû à ses propriétés géométriques pour les souris ayant subi une ovariectomie et recevant 2,5% de collagène hydrolysé par rapport aux souris témoins.

Conclusion :

Cette première étude nous montre que les peptides issus de l'ingestion du collagène hydrolysé agissent au niveau des ostéoblastes et modulent leur activité favorisant le remodelage osseux et à terme, la prise osseuse au niveau de la zone corticale des fémurs, induisant une résistance à la cassure plus élevée des os, et donc un plus faible risque de fracture.



Hydrolyzed collagen improves bone metabolism and biomechanical parameters in ovariectomized mice: An *in vitro* and *in vivo* study

Fanny Guillerminet^{a,b,d}, Hélène Beau pied^c, Véronique Fabien-Soul e^d, Daniel Tom e^{a,b}, Claude-Laurent Benhamou^c, Christian Roux^e, Anne Blais^{a,b,*}

^a INRA, UMR914 Nutrition Physiology and Ingestive Behavior, 75005 Paris, France

^b AgroParisTech, UMR914 Nutrition Physiology and Ingestive Behavior, 75005 Paris, France

^c Inserm U658, Orleans Regional Hospital and University of Orleans, Orleans 45000, France

^d Rousselot SAS, 6 rue Jean Jaur es, 92807 Puteaux, France

^e Université Paris Descartes, Département de Rhumatologie, APHP, Hôpital Cochin, Paris, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 8 June 2009

Revised 26 October 2009

Accepted 28 October 2009

Available online 4 November 2009

Edited by: D. Burr

Keywords:

Osteoblast

Osteoclast

Hydrolyzed collagen

Bone mineral density

Microarchitecture

ABSTRACT

Collagen has an important structural function in several organs of the body, especially in bone and cartilage. The aim of this study was to investigate the effect of hydrolyzed collagen on bone metabolism, especially in the perspective of osteoporosis treatment and understanding of its mechanism of action. An *in vivo* study was carried out in 12-week-old female C3H/HeN mice. These were either ovariectomized (OVX) or sham-operated (SHAM) and fed for 12 weeks with a diet containing 10 or 25 g/kg of hydrolyzed collagen. We measured bone mineral density (BMD) using dual-energy X-ray absorptiometry (DXA). C-terminal telopeptide of type I collagen (CTX), marker of bone resorption, and alkaline phosphatase (ALP), marker of bone formation, were assayed after 4 and 12 weeks. Femur biomechanical properties were studied by a 3-point bending test and bone architecture by microtomography. The BMD for OVX mice fed the diet including 25 g/kg of hydrolyzed collagen was significantly higher as compared to OVX mice. The blood CTX level significantly decreased when mice were fed with either of the diets containing hydrolyzed collagen. Finally, we have shown a significant increase in bone strength correlated to geometrical changes for the OVX mice fed the 25 g/kg hydrolyzed collagen diet. Primary cultures of murine bone cells were established from the tibia and femur marrow of BALB/c mice. The growth and differentiation of osteoclasts and osteoblasts cultured with different concentrations (from 0.2 to 1.0 mg/mL) of bovine, porcine or fish hydrolyzed collagens (2 or 5 kDa) were measured. Hydrolyzed collagens (2 or 5 kDa) in the tissue culture medium did not have any significant effects on cell growth as compared to controls. However, there was a significant and dose-dependent increase in ALP activity, a well-known marker of osteogenesis, and a decrease in osteoclast activity in primary culture of bone cells cultured with hydrolyzed collagens (2 kDa only) as compared to the control.

It is concluded that dietary hydrolyzed collagen increases osteoblast activity (as measured in primary tissue culture), which acts on bone remodeling and increases the external diameter of cortical areas of the femurs.

  2009 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Osteoporosis is a chronic disorder occurring mainly in postmenopausal women, characterized by reduced BMD and an increased risk of fracture. Bone loss originates from an imbalance between bone formation and bone resorption, especially after the menopause, which induces an increase of bone turnover by excess osteoclast activity. Nutritional components with potential anti-resorptive activity generally include calcium and cholecalciferol, but other components such as hydrolyzed type I collagen are also presumed to have an impact on bone metabolism [1].

* Corresponding author. AgroParisTech, UMR914, 16 rue Claude Bernard, F-75005 Paris, France. Fax: +33 144081825.
E-mail address: blais@agroparistech.fr (A. Blais).

Type I collagen is the major structural protein distributed throughout the whole body accounting for 25% of total body protein and for 80% of total conjunctive tissue in humans. It is an important component of bone, being the main extra cellular matrix protein for calcification, which also plays a role in osteoblast differentiation [2,3]. Some studies suggest that hydrolyzed collagen-enriched diet improves bone collagen metabolism and BMD. Oral administration of hydrolyzed collagen increased bone mass content and density in rats and mice fed a calcium- or protein-deficient diet [4,5]. Oral administration of hydrolyzed collagen was also demonstrated to increase the quantity of type I collagen and proteoglycans in the bone matrix of ovariectomized rats [1]. Moreover, in patients with osteoporosis, oral intake of hydrolyzed collagen with calcitonin had a stronger inhibitory effect on bone resorption than calcitonin alone [6]. Proteins represent a key nutriment for bone health and

thereby in the prevention of osteoporosis [7]. Protein undernutrition contributes to the occurrence of osteoporotic fracture in elderly. This may be associated with an uncoupling between increased bone formation and bone resorption, due to a decreased plasma insulin-like growth factor-I (IGF-I) levels [8]. Previous works showed that protein repletion after hip fracture in elderly patients was associated with increased serum levels of IGF-1 and attenuation of proximal femur bone loss [9].

The mechanisms by which ingestion of hydrolyzed collagen could improve bone formation remain unclear but have been suspected to be associated with the release and absorption of collagen-derived peptides acting on bone metabolism. Since Oesser et al. [10] demonstrated the intestinal absorption and the cartilage accumulation of collagen-derived peptides, it has been generally assumed that collagen-rich diets interact with the bone matrix. Indeed, collagen-derived di- and tripeptides rich in hydroxyproline such as Hyp, Pro-Hyp, Pro-Hyp-Gly or Gly-Pro-Val have been detected in human blood following the ingestion of hydrolyzed collagen [11]. Negligible amounts of the peptide form of hydroxyproline (Hyp) were observed in human blood before collagen ingestion. After its oral ingestion, the peptide form of Hyp significantly increased and reached a maximum level (20–60 nmol/mL of plasma) after 1–2 h and then decreased to half of the maximum level 4 h after ingestion. Moreover, some studies demonstrated the time-dependent degradation of Gly-Pro-Hyp, which is frequently found in collagen sequences, into the free-form Gly and a dipeptide, Pro-Hyp. The PEPT1 proton-dependent transporter assures the transport of Pro-Hyp across the intestinal barrier [12]. Among the collagen-derived peptides, Pro-Hyp-Gly, Pro-Hyp and analogs display chemotactic activity to fibroblasts, peripheral blood neutrophils [13,14] and monocytes [15], Asp-Gly-Glu-Ala stimulates osteoblast-related gene expression of bone marrow cells [16], Ala-Hyp and Gly-Pro-Val are potential inhibitors of angiotensin-converting enzyme [17,18], and Gly-Pro-Hyp could be involved in platelet aggregation [19].

In such a context, the aim of this study was to investigate both *in vivo* and *in vitro* the effects of hydrolyzed collagen used as a nutritional component on bone metabolism. For such a purpose, we used an ovariectomized C3H/HeN mouse model of postmenopausal osteoporosis and a primary culture of murine bone cells.

Materials and methods

Hydrolyzed collagens

Enzymatic hydrolyzed collagens were provided by Rousselot SAS, a Vion Company, (Puteaux, France) from the Rousselot® Peptan™ range. The hydrolyzed collagens were from bovine (Peptan™ B coded RDH), porcine (Peptan™ P coded PCH) and fish (Peptan™ F coded FGH) origins with molecular weights of 2 kDa (RDH-N, PCH-N, FGH-N) and 5 kDa (RDH, PCH, FGH). All preparations were food grade and can be obtained commercially. The hydrolyzed collagens were derived from the enzymatic hydrolysis of animal skins which are predominantly type I collagen. Bovine serum albumin (BSA; Euromedex; fraction V) was used as control protein for the *in vitro* experiments.

Ovariectomized mouse model

Thirty-two 6-week-old female C3H/HeN mice (Harlan) were housed in a room controlled for temperature (22 ± 1 °C) and a 12:12 light–dark cycle with free access to food and water for a 6-week adaptation period prior to the study. All experimental procedures used during the experiments complied with institutional policies and guidelines designed to prevent pain and distress. At 12 weeks of age, 24 mice were ovariectomized (OVX) and 8 sham-operated (SHAM). For the surgery, mice were anesthetized with ketamine (100 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg). Morphine was used as analgesic. One week

after the surgery, the OVX mice were divided into three groups of eight mice each. They were fed *ad libitum* for 12 weeks with a diet (AIN-93M with 240 g/kg soy protein as a protein source) containing 0 (OVX and SHAM), 10 (OVX10) or 25 (OVX25) g/kg hydrolyzed collagen PCH (Table 1). The monitoring of diet consumption showed an intake of about 3.5 g/day. These concentrations correspond to approximately 1 g/kg body weight of hydrolyzed collagen for OVX10 and 2.5 g/kg for OVX25. The mice had free access to water throughout the experiment. Twelve weeks after surgery mice were anesthetized and whole blood collected by cardiac puncture. Body composition was determined by dissection. Four white adipose tissue (WAT) pads (periovarian, retroperitoneal, mesenteric and total subcutaneous) were removed and weighed. The liver, intestines, uterus, brown adipose tissue and carcass (muscles and skeleton) were also weighed. Femurs and tibias were collected.

BMD quantification

Two, 4, 8, and 12 weeks after the surgery, bone mineral density (BMD) and bone mineral content (BMC) were measured by dual-energy X-ray absorptiometry (DXA) with a Lunar Piximus densitometer (GE Medical Systems, software version 1.4 lunar). The Piximus allows automated, accurate and precise measurement of bone density for small animals (10–50 g). The bone measurements exhibit excellent correlation between their ashes or chemical extraction weights ($r=0.99$). Blood samples were also collected (150 µl). The mice were weighed, anesthetized with ketamine (100 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg), and placed on the belly under the X-ray of the Lunar Piximus. BMD and BMC were measured for the whole body (excluding head and tail to improve sensitivity as suggested by the manufacturer), lumbar spines and the right femoral bone of each mouse [20].

Bone composition, geometric and biomechanical parameters

Both femurs and tibias were collected and preserved in dry conditions at -80 °C. One tibia from each mouse was dried overnight at 100 °C and ashed at 550 °C for 48 h. The ashes were extracted with 1 mL of 1 M HCl in order to quantify bone calcium content by atomic absorption spectrophotometry with a Zeeman polarized spectrophotometer. Non-mineral content was determined as the difference between the weight of the dried bones at 100 °C and the weight of the ashes. The mechanical properties of the mouse femurs were assessed by 3-point bending test using a Universal Testing Machine (Instron 4501, Instron, Canton, MA). Each femur was centrally loaded at the

Table 1
Composition of the diets (g/kg diet).

Ingredient (g/ kg diet)	Control	OVX10	OVX25
Soy protein ^a	200.2	190.2	175.2
PCH ^b	0	10	25
Corn starch ^c	569.2	569.2	569.2
Saccharose ^d	91.7	91.7	91.7
Soybean oil ^e	40	40	40
AIN 93 M mineral mixture ^f	35	35	35
AIN 93 M vitamin mixture ^f	10	10	10
Alpha-cellulose ^g	50.1	50.1	50.1
Choline ^h	2.3	2.3	2.3
Methionine ^h	1	1	1
Cysteine ^h	0.4	0.4	0.4

^a MP Biomedicals, Illkirch Graffenstaden, France.

^b Rousselot, Puteaux, France.

^c Cerestar, Haubourdin, France.

^d Eurosucre, Paris, France.

^e Bailly SA, Aulnay-sous-Bois, France.

^f ICN Pharmaceuticals, Orsay, France.

^g Medias Filtrants Durieux, Marne-la-Vallée, France (Alphacel, ICN Pharmaceuticals, Orsay, France).

mid-diaphysis at a speed of 1 mm/s. The extrinsic biomechanical parameters of stiffness (S , N/mm) and ultimate strength (F_U , N) were determined from load-displacement curves. The intrinsic biomechanical parameters Young's modulus (E , MPa) and ultimate stress (σ_U , MPa) were calculated from the load displacement curves and geometric properties as described previously [21]. The cross-sectional geometry of the diaphysis of each mouse femur was imaged by microcomputed tomography (μ CT, Skyscan 1072, Skyscan, Kontich, Belgium). Both medio-lateral and antero-posterior external and internal diameters of the cortical bone were measured at the mid-diaphysis. Cross-sectional cortical area (CSA, mm^2) and moment of inertia (I , mm^4) in relation to the horizontal axis were calculated as previously described [22].

CTX, glucose and bone ALP concentrations in blood

C-terminal telopeptide of type I collagen (CTX) concentration was measured in blood using an ELISA RatLaps™ kit (Osteomedical). Serum glucose was evaluated using a bioMerieux glucose RTU™ kit. Bone-specific alkaline phosphatase (ALP) activity was measured using *p*-nitrophenylphosphate in presence or absence of *L*-phenylalanine 0.1 M for the inhibition of the intestinal ALP as described by Dimai et al. [23]. Cell ALP activity was evaluated without *L*-phenylalanine and calculated as milliunits per mL of serum or milliunits per 1×10^5 cells. One unit is defined as the activity which hydrolyzes 1 μ mol of substrate to product per minute at 37 °C.

Primary tissue culture

Primary tissue co-culture of murine bone osteoblast and osteoclast cells was established from tibia and femur bone marrow obtained from 4-week-old BALB/c female mice (Harlan). Mice were killed by decapitation; tibias and femurs were removed aseptically then crushed with a scalpel on petri dishes containing α -MEM (Invitrogen) with 10% fetal bovine serum (FBS; Hyclone). Bone pieces and the medium with the cells were collected in a tube and vigorously shaken. The solution was filtered through a 70- μ m cell strainer. Cells were collected by centrifugation for 5 min at 800 g and resuspended in α -MEM with 10% FBS and 10^{-8} M of $1\alpha, 25$ -dihydroxyvitamin D_3 (Sigma). Cells obtained from four to five tibias were plated in one 75- cm^2 flask and cultured at 37 °C under a 5% CO_2 95% air atmosphere. After 6 days, cells were scraped off, collected and seeded in petri dishes at a density of 2.5×10^4 cells/ cm^2 . Twenty-four hours after seeding, proteins were added to the culture medium. Cells were grown in the presence of hydrolyzed collagens or BSA at a concentration of 0.2, 0.5 or 1.0 mg/mL. After 14 days, cell growth was measured using a FluoReporter® Blue Fluorometric dsDNA Quantitation Kit (Molecular Probes) as previously described [24]. The fluorometric method we used has been developed to count adherent cells in the range of 1000 to 100,000 cells per well for proliferation studies. In a first experiment, cells were counted and compared to DNA quantification. The standard curve obtained was used to correlate DNA quantification to number of cells per well. Morphological observation was performed by light microscopy at 100 \times magnification. Osteoclasts, which are large plurinucleate cells, were counted using Giemsa staining (Sigma).

The BD BioCoat™ Osteologic™ bone cell culture system (BD Bioscience) was used to characterize and measure osteoclast-mediated bone resorption. The preculture cell suspension was seeded at density of 4×10^4 cells/ cm^2 . Twenty-four hours after seeding, cells were incubated in the presence of 1 mg/mL BSA or PCH-N for 14 days. The digestion of sub-micron synthetic calcium phosphate thin films was observed using a light microscope with 10 \times magnification to evaluate resorption activity of the cells.

Statistical analysis

Statistical analyses were carried out using SAS version 9.1 with the data expressed as means \pm S.D. One-way ANOVA was performed using the GLM procedure of SAS with a Duncan multiple comparison test and a Tukey test *post hoc*. The MIXED procedure was used to perform repeated-measures ANOVA.

Results

Body composition of ovariectomized mice fed hydrolyzed collagen supplemented diet

Body weight change as function of time in SHAM, OVX, OVX10 and OVX25 mice is reported on Fig. 1. The OVX procedure induces a higher weight gain as compare to SHAM. However, no difference in body weight could be observed between OVX, OVX10 and OVX25 mice. Analysis of body composition as determined by dissection showed that after 12 weeks, OVX, OVX10 and OVX25 mice had significantly higher subcutaneous, perirenal and periovarian adipose tissue pad masses and a significantly lower uterine weight than the SHAM mice (Table 2). These results clearly show the effectiveness of ovariectomy. They also show that a hydrolyzed collagen enriched diet has no effect not only on body weight but also on adipose tissue or uterine weight of OVX mice. Moreover, no difference was observed between SHAM and OVX, OVX10 or OVX25 for carcass and kidney weight. Serum glucose determination after 12 weeks of diet supplementation showed that SHAM mice had a blood glucose level of 1.46 ± 0.14 g/L. This value is smaller than the values reported for the OVX, OVX10 or OVX25 mice which are similar with an average value of 1.67 ± 0.16 g/L. However, no significant differences between the groups are reported.

BMD in ovariectomized C3H/HeN mice fed hydrolyzed collagen supplemented diet

The change of total body BMD is shown in Fig. 2. Before surgery, the mean BMD for the mice was 0.041 g/cm. Surgery was performed

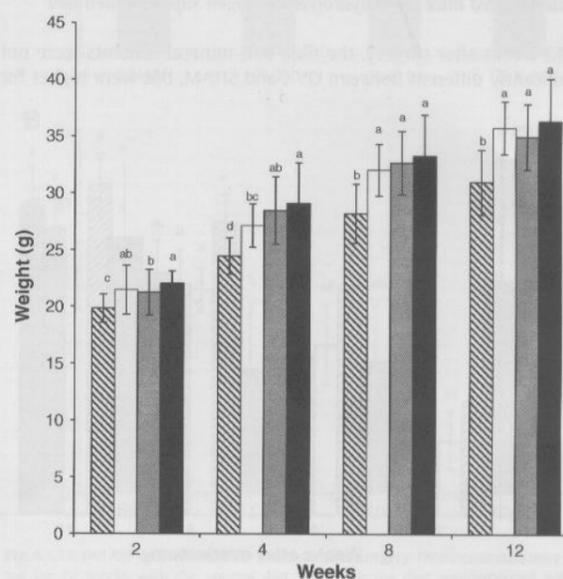


Fig. 1. Change of body weight 12 weeks after ovariectomy. Body weight was evaluated for SHAM (hatched), OVX (white), OVX10 (grey) and OVX25 (black) mice. Values are means \pm SD, $n = 8$. Groups with different letters are significantly different ($p < 0.05$).

Table 2
Body composition of SHAM, OVX, OVX10 and OVX25 mice 12 weeks after surgery.

Dietary groups	Initial body weight (g)	Final body weight (g)	Periovarian fat mass (g)	Mesenteric fat mass (g)	Perirenal fat mass (g)	Subcutaneous fat mass in the down part of the body (g)	Uterus (mg)	Kidneys (mg/g BW)	Carcass (g)
Sham	19.83 ± 1.24	32.6 ± 2.9 ^b	2.19 ± 0.83	0.83 ± 0.2	0.73 ± 0.19 ^b	1.54 ± 0.39 ^b	2.60 ± 0.65 ^a	10.9 ± 0.8	11.03 ± 0.63
OVX	21.47 ± 2.17	37.1 ± 4.1 ^a	1.89 ± 0.47	0.91 ± 0.29	0.86 ± 0.15 ^{ab}	1.89 ± 0.6 ^{ab}	1.03 ± 0.33 ^b	11.5 ± 0.9	12.85 ± 0.66
OVX10	21.25 ± 2.04	36.7 ± 3.9 ^a	2.19 ± 0.58	0.82 ± 0.37	1.07 ± 0.29 ^a	2.03 ± 0.56 ^a	0.92 ± 0.54 ^b	10.1 ± 0.8	11.82 ± 0.82
OVX25	22.06 ± 1.09	39.05 ± 4.6 ^a	2.10 ± 0.57	1.07 ± 0.36	1.09 ± 0.47 ^a	1.77 ± 0.64 ^a	1.29 ± 0.35 ^b	10.7 ± 0.9	12.58 ± 1.67

Values are means ± SD, n = 8. Values in a column with different letters are significantly different (p < 0.05).

at 12 weeks when BMD was still increasing. As reported previously [20], BMD continues to increase until 6 months; however the OVX procedure slows down BMD gain of OVX mice as compared to SHAM mice. As expected, the OVX mice had a significantly lower increase in BMD than the SHAM group from at least 8 weeks post-surgery until the end of the experiment (0.0049 ± 0.0018 vs. 0.0074 ± 0.0018 g/cm² at week 4 and 0.021 ± 0.002 vs. 0.017 ± 0.0019 g/cm² at week 12, respectively). This result shows the effectiveness of ovariectomy to increase bone resorption.

In a first experiment we tested a wide range of hydrolyzed collagen on bone metabolism from 0.2 to 10 g/kg of body weight per day. At 0.2 g/kg of body weight per day we did not observe any effect on the Bone Mineral Density (BMD) but at 1 and 2.5 g/kg of body weight per day we observed an increase of the BMD. Higher concentrations than 2.5 g/kg of body weight per day did not further improve BMD. Four and 8 weeks after the surgery the BMD of the OVX25 group was not significantly different from OVX and SHAM. However, after 12 weeks, OVX25 had a significantly higher increase in BMD compared to OVX (0.02 ± 0.0023 g/cm² vs. 0.017 ± 0.0019 g/cm², respectively, p < 0.05). Fig. 2 shows that OVX10 BMD was intermediate between OVX and OVX25 8 weeks after surgery, and had a significant higher increase in BMD at 12 weeks after the OVX procedure compared to OVX (0.0018 ± 0.0022 g/cm² vs. 0.017 ± 0.0019 g/cm² respectively, p < 0.05). Femoral BMD was also evaluated. Values reported for OVX25 were higher compared to OVX, but the difference was not significant (data not shown).

Bone composition, mechanical properties and microarchitecture of ovariectomized mice fed a hydrolyzed collagen supplemented diet

12 weeks after surgery, the tibia non-mineral contents were not significantly different between OVX and SHAM, but were higher for

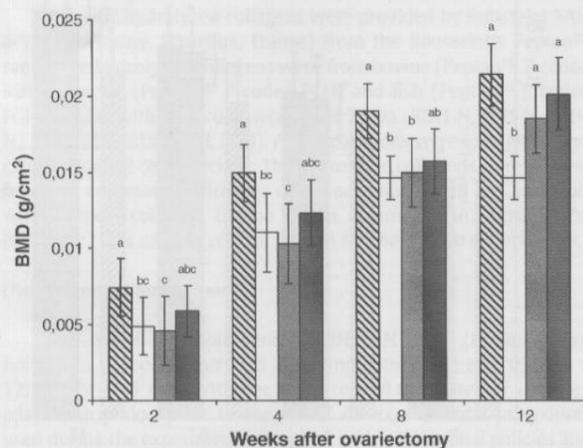


Fig. 2. Increase of bone mass density (BMD) of whole body 12 weeks after ovariectomy. BMD was evaluated for SHAM (hatched), OVX (white), OVX10 (grey) and OVX25 (black) mice. Values are means ± SD, n = 8. Groups with different letters are significantly different (p < 0.05).

OVX10 and OVX25 (321 ± 35 and 370 ± 44 mg/g bone vs. 396 ± 40 and 388 ± 63 mg/g bone respectively, p < 0.05; Table 3). Evaluation of femur mechanical properties showed no significant differences between groups for ultimate stress, Young's modulus and stiffness, whereas the moments of inertia were significantly different between OVX and OVX25 groups. Significant differences between OVX and OVX25 groups were also observed for some biomechanical parameters (Fig. 3): femur microarchitecture analysis showed that both the cortical area at mid-diaphysis and the ultimate strength were significantly greater in OVX25 than in OVX mice (1.25 ± 0.11 vs. 1.14 ± 0.07 mm² and 30.80 ± 2.88 vs. 28.67 ± 2.07 N respectively, p < 0.05). The increased thickness of the cortical area was related to a significant increase in the external mid-diaphysis diameters without change in the medullar area (data not shown).

Ingestion of a hydrolyzed collagen supplemented diet decreases bone resorption in ovariectomized mice

The bone turnover markers CTX and bone ALP were assayed in mouse plasma (Fig. 4). As expected, 12 weeks after surgery, we reported a significantly higher concentration of CTX in the plasma of OVX mice than in SHAM (12.42 ± 1.70 vs. 8.97 ± 2.43 µg/mL, respectively, p < 0.05) confirming the effectiveness of ovariectomy to increase osteoclast activity. Moreover, CTX plasma concentration was significantly lower for OVX10 and OVX25 (9.62 ± 2.02 and 9.45 ± 1.33 respectively) as compared to OVX, and did not differ from SHAM (Fig. 4A). Bone ALP was assayed 4 and 12 weeks after surgery (Fig. 4B). As expected this showed that its activity is always higher for SHAM than for OVX (27.68 ± 4.89 vs. 18.57 ± 4.67 mg/mL/min and 17.43 ± 2.93 vs. 12.76 ± 3.01 mg/mL/min for 4 and 12 weeks after surgery, respectively). This confirms the effectiveness of ovariectomy to decrease osteoblast activity (Fig. 4B). Four weeks after surgery, bone ALP for OVX 25 was higher than for OVX. However no difference could be seen after 12 weeks.

Hydrolyzed collagen increases osteoblast activity in co-culture of murine bone cells

We used primary culture of murine bone cells established from femur bone marrow obtained from Balb/c mice. The primary co-culture of osteoblasts and osteoclasts was grown in 48-well microplates in the presence of 1, 0.5 or 0.2 mg/mL BSA, PCH-N, FGH-N, RDH-N, PCH, RDH or FGH for 14 days. For all the hydrolyzed collagens tested, there was no effect on cell growth in comparison to the BSA control (Table 4). The results were expressed as a stimulation index (SI), calculated as the ratio of DNA content in the presence of hydrolyzed collagen as compared to a BSA control. ALP activity, a marker of the osteogenic activity of osteoblasts, was significantly increased in the presence of 1 mg/mL PCH-N, RDH-N and FGH-N but was not modified in the presence of 1 mg/mL PCH, RDH and FGH as compared to BSA. Addition of 0.5 mg/mL PCH-N and RDH-N also induced an increase in ALP activity whereas FGH-N, PCH, RDH and FGH had no effect when compared to BSA. However, no effect on ALP activity was reported after addition of 0.2 mg/mL of any of the

Table 3
Composition of tibias and biomechanical parameters of femurs 12 weeks after surgery.

Dietary groups	Tibia composition				Femur mechanical properties				
	Weight of dried bones (mg)	Mineral content (mg/g bone)	Calcium content (mg/g mineral content)	Non-mineral content (mg/g bone)	Moment of inertia, I (mm^4)	Ultimate stress, σ_0 (MPa)	Young's modulus, E (MPa)	Stiffness, S (N/mm)	Energy (N mm)
SHAM	555 ± 69	254 ± 4	325 ± 47	370 ± 44 ^{ab}	0.124 ± 0.019 ^{ab}	280 ± 24	13106 ± 2462	151 ± 22	8.73 ± 1.58
OVX	523 ± 65	262 ± 2	289 ± 14	321 ± 35 ^b	0.124 ± 0.016 ^a	275 ± 14	13366 ± 1193	155 ± 11	8.16 ± 0.99
OVX10	557 ± 53	241 ± 2	337 ± 29	396 ± 40 ^a	0.114 ± 0.015 ^b	285 ± 20	14276 ± 1555	152 ± 21	8.40 ± 1.31
OVX25	554 ± 83	238 ± 5	358 ± 64	388 ± 63 ^a	0.143 ± 0.011 ^a	267 ± 27	12570 ± 1739	167 ± 20	9.18 ± 1.99

Values are means ± SD, $n = 8$. Values in a column with different letters are significantly different ($p < 0.05$).

hydrolyzed collagens tested (Table 4). Moreover, as reported in Figs. 5A and B, the presence of 1 mg/mL PCH-N in the culture medium allowed the osteoblasts to acquire a star shape whereas osteoclast numbers were not modified, the control experiments being performed with BSA dissolved in the culture medium. To better characterize the effects of PCH-N on osteoclasts, murine bone primary tissue culture was performed for 14 days using the BD BioCoat™ Osteologic™ bone cell culture system which allows measurement of osteoclast-mediated bone resorption. Osteoclast activity was measured by digestion of a sub-micron synthetic calcium phosphate film. As indicated in Figs. 5C and D, presence of PCH-N (1 mg/mL) in the culture medium reduced resorption area as compared to the BSA control.

Discussion

The present study shows that hydrolyzed collagens are able to increase *in vivo* and *in vitro* bone metabolism. To evaluate the efficiency of hydrolyzed collagen to modify bone turnover, we used an ovariectomized mice model. Our results show that feeding a diet enriched with 25 g/kg hydrolyzed collagen is able to significantly increase bone metabolism as well as the biomechanical properties (such as BMD) of OVX animals. Moreover, an assay of the bone turnover marker CTX reinforced the view that a diet enriched with hydrolyzed collagen is able to decrease bone resorption in OVX mice. Taking into account that osteoporosis can be defined as the capacity of

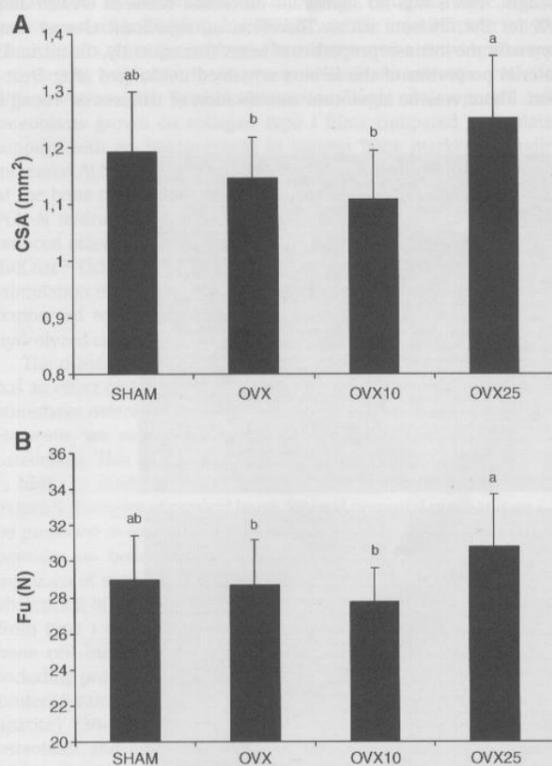


Fig. 3. Cross sectional area and ultimate strength of femurs after 12 weeks ingestion of the experimental diets. Ovariectomized mice were fed for 12 weeks with control diet (OVX), or the diet supplemented with 10 (OVX10) or 25 (OVX25) g/kg of PCH. The sham-operated mice were fed for 12 weeks with the control diet (SHAM). (A) Cross-sectional area 12 weeks after ovariectomy. (B) Ultimate strength 12 weeks after ovariectomy. Groups with different letters are significantly different ($p < 0.05$).

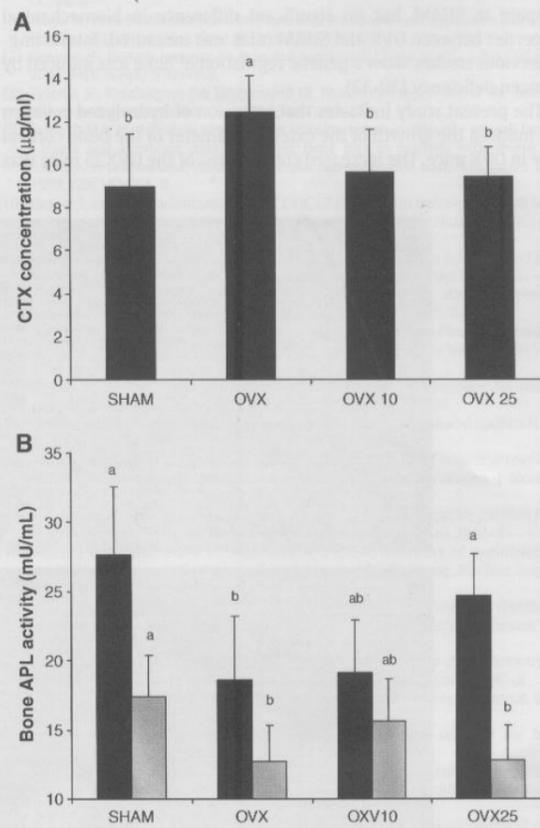


Fig. 4. CTX and ALP quantification at 12 weeks after surgery. Ovariectomized mice were fed for 12 weeks with the control diet (OVX), or the diet supplemented with 10 (OVX10) or 25 (OVX25) g/kg of PCH. The sham-operated mice were fed for 12 weeks with the control diet (SHAM). (A) CTX quantification 12 weeks after ovariectomy. (B) ALP quantification 4 (black) and 12 (grey) weeks after ovariectomy. Groups with different letters are significantly different ($p < 0.05$).

Table 4
Effect of hydrolyzed collagens on cell growth and ALP activity of osteoblasts in primary culture of murine bone cells obtained from 4-week-old Balb/c female mice.

Protein	Cell growth (SI)	ALP (mU/1 × 10 ⁵ cells)	Cell growth (SI)	ALP (mU/1 × 10 ⁵ cells)	Cell growth (SI)	ALP (mU/1 × 10 ⁵ cells)
	1 mg/mL		0.5 mg/mL		0.2 mg/mL	
BSA	1.00 ± 0.18	0.42 ± 0.17 ^b	1.00 ± 0.16	0.45 ± 0.068 ^b	1.00 ± 0.06	0.51 ± 0.17
RDH-N	0.95 ± 0.03	2.13 ± 0.76 ^a	1.04 ± 0.22	1.45 ± 0.089 ^a	1.01 ± 0.15	0.64 ± 0.10
PCH-N	1.08 ± 0.16	1.71 ± 0.85 ^a	1.18 ± 0.20	1.81 ± 0.84 ^{ab}	1.09 ± 0.05	0.87 ± 0.48
FGH-N	0.99 ± 0.08	2.13 ± 0.76 ^a	1.11 ± 0.19	1.80 ± 0.3 ^a	0.92 ± 0.12	0.80 ± 0.047
RDH	0.75 ± 0.07	0.77 ± 0.53 ^b	0.80 ± 0.18	0.78 ± 0.26 ^b	0.91 ± 0.18	1.01 ± 0.47
PCH	0.87 ± 0.11	0.77 ± 0.37 ^b	1.03 ± 0.09	0.65 ± 0.44 ^b	1.10 ± 0.20	0.61 ± 0.21
FGH	0.75 ± 0.07	0.68 ± 0.41 ^b	0.84 ± 0.19	0.34 ± 0.11 ^b	0.88 ± 0.11	0.72 ± 0.43

Alkaline phosphatase (ALP) was evaluated as function of cell density in the presence of hydrolyzed collagens for 15 days. Values are means ± SD, of three different cell cultures done in triplicate. Values in a column with different letters are significantly different ($p < 0.05$).

the bone to increase bone resorption, the understanding of how osteoporosis can be reduced requires the study of the mechanical behavior of the bone tissue. Biomechanical properties of mouse femurs were then assessed by a three-point bending test which is one of the most common test used with small animals such as mice [25]. A model of low bone mass phenotype such as C57BL/6 and high mass such as C3H/HeN [29] may be useful for further studies. In the present study, C3H/HeN ovariectomized mice or sham-operated mice were used as an *in vivo* animal model of postmenopausal osteoporosis. The OVX procedure was performed at 12 weeks when BMD was still increasing. Using this model, we observed a reduced rate of bone mass gain and 12 weeks later a lower BMD for OVX was observed as compare to SHAM, but no significant difference in biomechanical properties between OVX and SHAM mice was measured. Interestingly, previous studies show a genetic regulation of bone loss induced by estrogen deficiency [30–32].

The present study indicates that ingestion of hydrolyzed collagen diet induced the growth of the external diameter of the bone cortical zone in OVX mice. The increased cortical area of the OVX25 mice was

correlated with a significant increase in the femur external diameter, without modification of the size of the medullar area. Therefore, the increased size of the cortical area was induced by a periosteal apposition of bone on the mouse femur. Due to this increase in bone size, the ultimate strength of OVX10 and OVX25 mice femurs was significantly greater than OVX. These results are in agreement with previous studies showing a correlation between bone strength and external diameter [26]. The increase of the external diameter of the femur for OVX25 as compared to OVX also suggests a higher level of bone formation for mice eating the hydrolyzed collagen-rich diets. However, 12 weeks after surgery, OVX25 bone ALP was similar to OVX. This result suggests that hydrolyzed collagen intake had a rapid and maybe transient effect on bone formation. However the effect allowed an increase of bone cortical area which increased femur strength. There was no significant difference between OVX25 and OVX for the ultimate stress. Therefore, no significant change was shown for the intrinsic properties of bone. Consequently, the intrinsic material properties of the femurs remained unchanged after treatment. There was no significant modification of stiffness or Young's

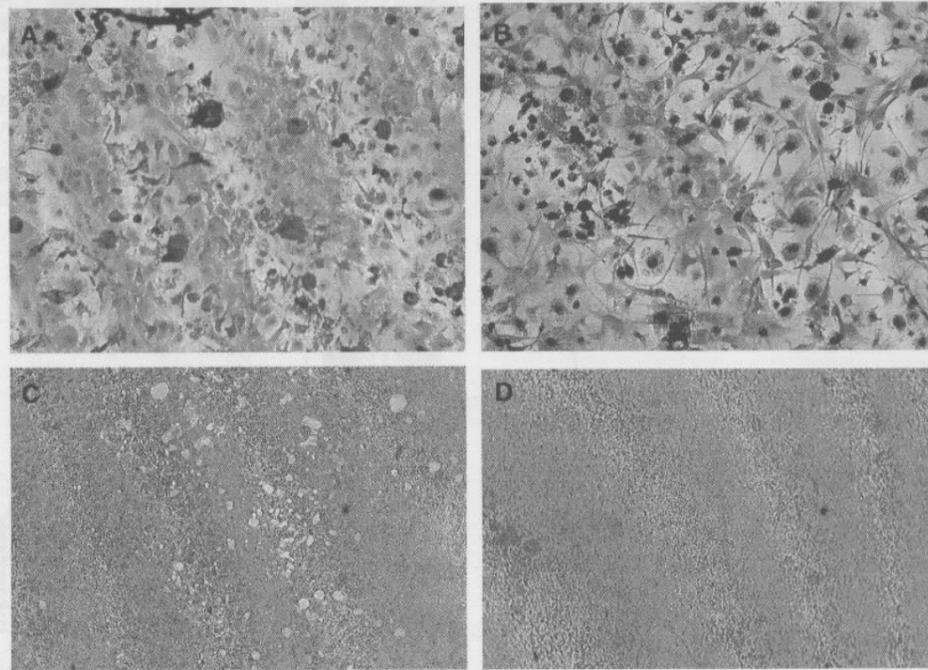


Fig. 5. Effect of hydrolyzed collagen on primary culture of murine bone cells in the presence of hydrolyzed collagens for 15 days. (A) Observation of bone cells with optical microscope (100) for cells cultured with 1 mg/mL of BSA added in the culture medium. (B) Observation of bone cells with optical microscope (100) for cells cultured with 1 mg/mL of PCH-N added in the culture medium. (C) Observation of pit assays with optical microscope (10) for cells culture with 1 mg/mL of BSA added in the culture medium. (D) Observation of pit assays with optical microscope (10) for cells culture with 1 mg/mL of PCH-N added in the culture medium.

modulus between groups. However there was a trend towards greater bone stiffness in OVX25 than for other groups. Assuming that the stiffness of bone is correlated to the amount of type I collagen present [27,28], and since some previous studies showed an increase of type I collagen and proteoglycan excretion for mice fed hydrolyzed collagen [5], further studies are needed to quantify the new formation of type I collagen in the bone of these mice.

The *in vitro* results obtained with primary tissue culture of murine bone cells demonstrated that some of the tested hydrolyzed collagens were able to stimulate cell growth and ALP activity, a marker of osteogenesis. A study of Ohara et al. [33] compared quantity and structures of food-derived gelatin hydrolysates in human blood from fish scale, fish skin and porcine skin type I collagen in a single blind crossover study. Amounts of free Hyp and Hyp-containing peptide were measured over a 24-h period. Hyp-containing peptides comprised approximately 30% of all detected Hyp. The total area under the concentration–time curve of the fish scale group was significantly higher than that of the porcine skin group. Pro-Hyp was a major constituent of Hyp-containing peptides. Ala-Hyp, Leu-Hyp, Ile-Hyp, Phe-Hyp, and Pro-Hyp-Gly were detected only with fish scale or fish skin gelatin hydrolysates. Ala-Hyp-Gly and Ser-Hyp-Gly were detected only with fish scale gelatin hydrolysate. The quantity and structure of Hyp-containing peptides in human blood after oral administration of hydrolyzed collagen depends on the collagen source. But this effect depends not only on collagen origin but also on the molecular size of the hydrolyzed collagens, proving that small peptides interact with bone cells, and not all the collagen molecule. Collagen needs to be hydrolyzed to be able to interact with bone metabolism. In our studies, all the tested collagens were able to increase osteoblast activity but PCH-N was the most efficient *in vitro*. These results are in line with previous observations showing that type I collagen was able to increase MG-63 osteoblastic cell line differentiation [34]. Similar observations were also reported with osteoblasts grown on collagen type I films compared to a plastic support with an improvement in various bone markers including increased ALP activity and an accelerated and uniform mineralization of the bone matrix [35]. Moreover, the present results showed that PCH-N hydrolyzed collagen did not modify osteoclast growth but reduced osteoclast differentiation. As observed using the *in vitro* BD BioCoat™ Osteologic™ bone cell culture system, this combination of a stimulation of osteoblast activity with a reduced osteoclast differentiation led to reduced bone resorption in the presence of PCH-N hydrolyzed collagen.

The present study furthermore showed that hydrolyzed collagen has an effect on bone resorption factors and supports the idea that it stimulates osteoblast activity. Osteoclast growth was not modified. However, we reported a lower differentiation and maturation of osteoclasts. This effect, combined with increased osteoblast activity, is likely to modulate bone turnover leading to the growth of the external diameter of cortical bone. Several potential mechanisms can be proposed to explain the influence of hydrolyzed collagen-derived peptides on bone metabolism. Some results have suggested that ingestion of type I hydrolyzed collagen leads to the production and absorption of collagen-derived peptides similar to peptides released from type I collagen *in situ* during bone resorption which act on bone cell metabolism [6]. Osteoblast activity involves three steps including proliferation, matrix protein synthesis (type I collagen and proteoglycans) and mineralization of the bone matrix (hydroxyapatite) [36–38]. Several hormones and cytokines can modulate osteoblast and osteoclast differentiation and activity. The cytokine TGF- β which is stored in a latent form in the bone matrix, and secreted during the bone resorption phase is believed to exert such an effect [39]. TGF- β stimulates type I collagen and proteoglycan production while inhibiting that of hydroxyapatite. Interestingly, the type I collagen-derived peptide DGEA (asparagine, glycine, glutamine and alanine) was shown to interact with α 2 β 1 integrin located on the

osteoblast cell membrane. This interaction leads to inhibition of TGF- β and consequently bone matrix protein synthesis [2,3,10,40]. Other results showed that hydrolyzed collagen-derived peptides increase type I collagen and proteoglycan production but in this case the active peptides remains to be identified [1].

Taken together, the results of the present study indicate that hydrolyzed collagen modulates bone formation and mineralization of the bone matrix by stimulating osteoblast growth and differentiation while reducing osteoclast differentiation. These effects led to growth of the external diameter of the cortical zone. These results could be of potential interest for nutritional intervention in the prevention of bone loss.

References

- Nomura Y, et al. Increase in bone mineral density through oral administration of shark gelatin to ovariectomized rats. *Nutrition* 2005;21(11–12):1120–6.
- Takeuchi Y, Nakayama K, Matsumoto T. Differentiation and cell surface expression of transforming growth factor-beta receptors are regulated by interaction with matrix collagen in murine osteoblastic cells. *J Biol Chem* 1996;271(7):3938–44.
- Takeuchi Y, et al. Differentiation and transforming growth factor-beta receptor down-regulation by collagen-alpha2beta1 integrin interaction is mediated by focal adhesion kinase and its downstream signals in murine osteoblastic cells. *J Biol Chem* 1997;272(46):29309–16.
- Wu J, et al. Assessment of effectiveness of oral administration of collagen peptide on bone metabolism in growing and mature rats. *J Bone Miner Metab* 2004;22(6):547–53.
- Koyama Y, et al. Ingestion of gelatin has differential effect on bone mineral density and body weight in protein undernutrition. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 2001;47(1):84–6.
- Adam M, et al. Postmenopausal osteoporosis. Treatment with calcitonin and a diet rich in collagen proteins. *Cas Lek Cesk* 1996;135(3):74–8.
- Bonjour JP. Dietary protein: an essential nutrient for bone health. *J Am Coll Nutr* 2005;24(6 Suppl):526S–36S.
- Thissen JP, Ketelslegers JM, Underwood LE. Nutritional regulation of the insulin-like growth factors. *Endocr Rev* 1994;15(1):80–101.
- Schurch MA, et al. Protein supplements increase serum insulin-like growth factor-I levels and attenuate proximal femur bone loss in patients with recent hip fracture. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Ann Intern Med* 1998;128(10):801–9.
- Oesser S, et al. Oral administration of (14)C labeled gelatin hydrolysate leads to an accumulation of radioactivity in cartilage of mice (C57/BL). *J Nutr* 1999;129(10):1891–5.
- Iwai K, et al. Identification of food-derived collagen peptides in human blood after oral ingestion of gelatin hydrolysates. *J Agric Food Chem* 2005;53(16):6531–6.
- Aito-Inoue M, et al. Transport of a tripeptide, Gly-Pro-Hyp, across the porcine intestinal brush-border membrane. *J Pept Sci* 2007;13(7):468–74.
- Postlethwaite AE, Seyer JM, Kang AH. Chemotactic attraction of human fibroblasts to type I, II, and III collagens and collagen-derived peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1978;75(2):871–5.
- Laskin DL, et al. Chemotactic activity of collagen-like polypeptides for human peripheral blood neutrophils. *J Leukoc Biol* 1986;39(3):255–66.
- Postlethwaite AE, Kang AH. Collagen- and collagen peptide-induced chemotaxis of human blood monocytes. *J Exp Med* 1976;143(6):1299–307.
- Mizuno M, Kuboki Y. Osteoblast-related gene expression of bone marrow cells during the osteoblastic differentiation induced by type I collagen. *J Biochem* 2001;129(1):133–8.
- Kim SK, et al. Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides purified from bovine skin gelatin hydrolysate. *J Agric Food Chem* 2001;49(6):2992–7.
- Oshima G, Shimabukuro H, Nagasawa K. Peptide inhibitors of angiotensin I-converting enzyme in digests of gelatin by bacterial collagenase. *Biochim Biophys Acta* 1979;566(1):128–37.
- Knight CG, et al. Collagen-platelet interaction: Gly-Pro-Hyp is uniquely specific for platelet Gp VI and mediates platelet activation by collagen. *Cardiovasc Res* 1999;41(2):450–7.
- Nagy TR, Clair AL. Precision and accuracy of dual-energy X-ray absorptiometry for determining *in vivo* body composition of mice. *Obes Res* 2000;8(5):392–8.
- Turner CH, Burr DB. Basic biomechanical measurements of bone: a tutorial. *Bone* 1993;14(4):595–608.
- Di Masso RJ, et al. Long-bone biomechanics in mice selected for body conformation. *Bone* 1997;20(6):539–45.
- Dimai HP, et al. Alkaline phosphatase levels and osteoprogenitor cell numbers suggest bone formation may contribute to peak bone density differences between two inbred strains of mice. *Bone* 1998;22(3):211–6.
- Blais A, et al. Oral bovine lactoferrin improves bone status of ovariectomized mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2009.
- Beaupied H, Lespessailles E, Benhamou CL. Evaluation of macrostructural bone biomechanics. *Joint Bone Spine* 2007;74(3):233–9.
- Currey JD. Bone strength: what are we trying to measure? *Calcif Tissue Int* 2001;68(4):205–10.
- Burr DB. The contribution of the organic matrix to bone's material properties. *Bone* 2002;31(1):8–11.

- [28] Mann V, et al. A COL1A1 Sp1 binding site polymorphism predisposes to osteoporotic fracture by affecting bone density and quality. *J Clin Invest* 2001;107(7):899–907.
- [29] Voide R, van Lenthe GH, Muller R. Differential effects of bone structural and material properties on bone competence in C57BL/6 and C3H/He inbred strains of mice. *Calcif Tissue Int* 2008;83(1):61–9.
- [30] Bouxsein ML, et al. Ovariectomy-induced bone loss varies among inbred strains of mice. *J Bone Miner Res* 2005;20(7):1085–92.
- [31] Li CY, et al. Genetic background influences cortical bone response to ovariectomy. *J Bone Miner Res* 2005;20(12):2150–8.
- [32] Ward WE, et al. Serum equol, bone mineral density and biomechanical bone strength differ among four mouse strains. *J Nutr Biochem* 2005;16(12):743–9.
- [33] Ohara H, Matsumoto H, Ito K, Iwai K, Sato K. Comparison of quantity and structures of hydroxyproline-containing peptides in human blood after oral ingestion of gelatin hydrolysates from different sources. *J Agric Food Chem* 2007;55(4):1532–5.
- [34] Andrianarivo AG, et al. Growth on type I collagen promotes expression of the osteoblastic phenotype in human osteosarcoma MG-63 cells. *J Cell Physiol* 1992;153(2):256–65.
- [35] Lynch MP, et al. The influence of type I collagen on the development and maintenance of the osteoblast phenotype in primary and passaged rat calvarial osteoblasts: modification of expression of genes supporting cell growth, adhesion, and extracellular matrix mineralization. *Exp Cell Res* 1995;216(1):35–45.
- [36] Stein GS, Lian JB. Molecular mechanisms mediating proliferation/differentiation interrelationships during progressive development of the osteoblast phenotype. *Endocr Rev* 1993;14(4):424–42.
- [37] Owen TA, et al. Pleiotropic effects of vitamin D on osteoblast gene expression are related to the proliferative and differentiated state of the bone cell phenotype: dependency upon basal levels of gene expression, duration of exposure, and bone matrix competency in normal rat osteoblast cultures. *Endocrinology* 1991;128(3):1496–504.
- [38] Quarles LD, et al. Distinct proliferative and differentiated stages of murine MC3T3-E1 cells in culture: an in vitro model of osteoblast development. *J Bone Miner Res* 1992;7(6):683–92.
- [39] Oreffo RO, et al. Activation of the bone-derived latent TGF beta complex by isolated osteoclasts. *Biochem Biophys Res Commun* 1989;158(3):817–23.
- [40] Xiao G, et al. Role of the alpha2-integrin in osteoblast-specific gene expression and activation of the Osf2 transcription factor. *J Biol Chem* 1998;273(49):32988–94.

2. Hydrolyzed collagen improves bone status and prevents bone loss in ovariectomized C3H/HeN mice

Fanny Guillerminet^{1,4}, Véronique Fabien-Soulé⁴, Patrick C. Even¹, Hélène Beaupied³, Daniel Tomé¹, Claude-Laurent Benhamou³, Christian Roux⁵, Anne Blais¹

¹USC Nutrition Physiology and Ingestive Behavior, 75005 Paris, France

²AgroParisTech, UMR914 Nutrition Physiology and Ingestive Behavior, 75005 Paris, France

³Inserm U658, Orléans Regional Hospital and University of Orléans, Orléans 45000, France

⁴Rousselot SAS, 6 rue Jean Jaurès F 92807 Puteaux cedex, France

⁵Université Paris Descartes, Département de Rhumatologie, APHP, Hôpital Cochin, Paris, France

Dans l'article précédent nous avons montré que la prise de 25 g/kg de régime de collagène hydrolysé pendant 12 semaines entraîne l'augmentation de la formation osseuse chez les souris C3H/HeN ayant subi une ovariectomie à 3 mois. En effet, nos résultats nous ont montré une amélioration des paramètres biomécaniques osseux chez les animaux, en induisant une augmentation du diamètre externe de la zone corticale, sans modification de la taille de la zone médullaire. En conséquence de cette augmentation de diamètre, les fémurs des souris sont plus résistants à la cassure. Nos résultats *in vitro* tendent à montrer que ce résultat serait dû à une augmentation de l'activité ostéoblastique et à une diminution de l'activité de résorption des ostéoclastes lorsque les cellules sont en présence de peptides issus de la dégradation du collagène hydrolysé.

Suite à ces résultats, le but de cette étude est de définir de façon plus précise notre modèle ovariectomie et dans quel contexte nous observons une action du collagène hydrolysé sur l'os.

Le suivi de la prise alimentaire pendant dix jours des souris ayant subi une ovariectomie et nourries *ad libitum* par le régime standard, *ad libitum* par le régime collagénique ou gavées en collagène hydrolysé nous indique qu'il n'y a pas de différence sur la quantité de régime pris par jour en fonction de ces groupes. La nourriture est donnée sous forme de boulettes farine + eau, afin d'éviter au maximum les miettes, pour 4 souris par cage, une fois tous les deux jours. Les souris gavées reçoivent leur complément de nourriture de la même façon. Le gavage a été effectué 2 fois par jour à la même heure (9h du matin et 18h), tous les jours de la semaine.

Un groupe témoin gavé à l'eau afin d'évaluer le biais induit par le stress du gavage, a été suivi. Les

résultats de ce groupe restent difficiles à interpréter (DMO qui chute au cours de l'expérience, perte de poids ...) et traduisent sûrement qu'il y a eu des biais dans le suivi de ce groupe, mais nous permettent cependant de confirmer qu'il y a sûrement un stress dû au gavage qui intervient dans nos résultats pour le groupe de souris gavé au collagène hydrolysé. Ce suivi est succinct, et ne suffit pas à tirer de plus amples conclusions. En effet, il aurait fallu effectuer un suivi sur une durée plus longue sur des souris isolées dans leurs cages avec installation d'une grille au sol évitant les comportements coprophages, voire travailler sur des rats qui constituent un modèle plus adapté pour faire de la prise alimentaire. Cependant, ce suivi nous permet de nous faire une première idée sur le comportement alimentaire des souris.

Nous n'avons pas obtenu de résultats différents entre les groupes prenant le collagène ad libitum ou par gavage, ce qui montre qu'il n'y a pas d'effet selon la prise alimentaire, effectuée en aiguë ou en continu.

Nos résultats ont montré que la DMO du groupe OVX25^c reste en augmentation juste après la chirurgie, contrairement à ce que l'on observe normalement après opération chez toutes les souris ovariectomisées. Les seuls autres groupes ne subissant pas de décroissance osseuse 2 semaines après la chirurgie sont les souris SHAM et celles supplémentées en raloxifène. De plus, 8 semaines après chirurgie, la DMO des pOVX25^c est similaire à celle des SHAM et significativement supérieure à celle du groupe OVX contrôle. La concentration plasmatique en CTX est plus faible de façon significative pour pOVX25^c, OVX25g^c et OVX25^c que pour OVX^c. Il y aurait donc un effet préventif de la prise de collagène hydrolysé sur la perte osseuse.

Conclusion :

Cette deuxième étude confirme l'effet des peptides issus de l'ingestion du collagène hydrolysé sur un modèle de souris ayant atteint sa phase de stabilisation de croissance osseuse. Dans ce modèle, les peptides de collagène agissent sur le remodelage osseux de la section corticale des fémurs, ce qui augmente l'élasticité de sa matrice.

De plus, la prise de collagène peut être effectuée de façon aiguë et continue.

Enfin, il y aurait un effet préventif de la prise de collagène hydrolysé sur la santé osseuse. Ces dernières données nous permettent d'extrapoler un protocole pour une future étude clinique.

ABSTRACT

Introduction: Hydrolyzed collagen can play an important role in preserving bone mineral density before osteoporosis appears. The aim of this study was to evaluate the effect of hydrolyzed collagen on bone health of ovariectomized mice (OVX) at different ages.

Methods: Two *in vivo* experiments were realized. The first one was carried out on 3- and 6-month-old OVX mice fed for 26 weeks with a diet including 0, 10 or 25 g/kg of hydrolyzed collagen. The second one was carried on 3-month-old OVX mice fed for 12 weeks with a diet including 0 or 25g/kg of hydrolyzed collagen. A first group received the collagen supplementation one month before surgery (pOVX25). Two other groups received the supplementation just after the surgery, one fed ad libitum (OVX25) and one fed by gavages (gOVX25). Mice treated with raloxifene were used as a positive control (OVXr). Bone mineral density (BMD), femur biomechanical and C-terminal telopeptide of type I collagen were assayed after 12 and 26 weeks. Food intake and spontaneous physical activity (SPA) were also recorded.

Results: The OVX procedure increased body weight without increasing food intake. In contrast mice resting metabolism was found to decrease. Twenty-six weeks after the OVX procedure, collagen ingestion was still able to significantly improve BMD and some femur biomechanical parameters such as the cortical section area and the stiffness. Our results also demonstrated that, when mice were fed with hydrolyzed collagen during one month before surgery, BMD did not decrease just after surgery.

Conclusion This study confirms that dietary collagen reduces bone loss in OVX mice by increasing diameter of the cortical areas of femurs. In addition our results indicate that collagen can have a preventive effect.

Keywords: hydrolyzed collagen, ovariectomy, bone mineral density, microarchitecture

INTRODUCTION

Osteoporosis is a critical disorder characterized by bone loss and an increased risk of fracture due to an imbalance between bone formation and bone resorption occurring mainly, although not only, in postmenopausal women as a consequence of estrogen deficiency that increases osteoclast activity [1]. The different factors involved in bone strength include bone mineral density (BMD) and bone crystal characteristics, bone protein matrix and collagen fiber quality, bone micro architecture and micro lesion, bone geometry and morphology (bone size, shape, micro architecture), and the intrinsic properties of the bone material [2]. Cortical bone strength, whose main role is to protect bone integrity, is influenced by mineralization, porosity, orientation of collagen fibers, extent and nature of collagen cross-linking, number and composition of cement lines as well as presence of micro damages [3, 4, 5, 6].

Nutritional factors play important role in bone development during growth, and in bone maintenance throughout adulthood [7]. Nutritional components with potential anti-resorptive activity include calcium, cholecalciferol (vitamin D) and proteins which are key nutrients for bone health maintenance and prevention of osteoporosis [8, 9, 10]. Low protein intake contributes to the occurrence of osteoporotic fracture in the elderly and this may be associated with an uncoupling between increased bone formation and bone resorption due to decreased plasma levels of insulin-like growth factor-I (IGF-I) level [11]. In contrast, despite some controversies related to high protein intake, the majority of the studies show a beneficial effect of an increase in protein intake on bone metabolism and protein repletion after hip fractures in elderly patients. This has been associated with increased plasma levels of IGF-1 and attenuation of proximal femur bone loss [12, 13, 14].

Among different proteins, the intake of hydrolyzed collagen in animal models has been demonstrated to improve bone mass density (BMD), bone mineral content (BMC) and to increase the quantity of collagen I and proteoglycans in the bone matrix [15, 16, 17, 18, 19]. The action of hydrolyzed collagen on bone metabolism may involve the release of different collagen-derived peptides in the blood including free Hydroxyproline (Hyp), Pro-Hyp and other Hyp-containing peptides such as Ala-Hyp, Leu-Hyp, Ile-Hyp, Phe-Hyp, and Pro-Hyp-Gly [20]. The peptides released from collagen digestion are presumed to mimic the ones released by osteoclasts during the bone matrix resorption phase. The peptides released have been shown to act on osteoblast activity especially on their mineralization step (faudrait une ref).

The aim of this study was (i) to evaluate in mice the effect of hydrolyzed collagen intake on bone loss induced by ovariectomy at different ages, (ii) to clarify the effect of the administration route (periodical gavages or *ab libitum* food intake) and (iii) to determine whether hydrolyzed collagen given before the OVX procedure could have a preventive effect on bone loss. Young (3 months) or adult mice (6 months) were ovariectomized and collagen, incorporated into the food or given by gavages, was given from either 1 month before or immediately after the OVX procedure. The effect of collagen was compared to soy or casein proteins and raloxifene used as a positive control since this selective estrogen receptor modulator is effective in preserving bone OVX-induced changes.

MATERIALS AND METHODS

Hydrolyzed collagens and ovariectomized mouse model.

Enzymatic hydrolyzed collagen was provided by Rousselot SAS, a Vion Company, (Puteaux, France) from the Rousselot® Peptan™ range. The hydrolyzed collagen was from porcine origin (Peptan™ P coded PCH) with a molecular weight of 5 kDa. The preparation was food grade and can be obtained commercially. The hydrolyzed collagen was derived from the enzymatic hydrolysis of animal skin which is predominantly type 1 collagen.

134 six-week old C3H/HeN mice (Harlan) were housed in a room controlled for temperature ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) with a 12:12 light-dark cycle and free access to food and water for a 6-week adaptation period prior to the study. The experiment was carried out according to the guidelines of the French National Committee for Animal Care and the European Convention of Vertebrate Animals Used for Experimentation, under European Council Directive 86/609/EEC dated November, 1986. For surgeries, mice were anesthetized with ketamine (100 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg). Morphine was used post-operatively as an analgesic.

Experimental design

The design of the animal protocols is described in Table 1.

- The first experiment included 8 groups of 8 mice and studied the effect of collagen ingestion for 26 weeks. Mice were sham-operated (SHAM) or ovariectomized at 3 (₃OVX) or 6 (₆OVX) months. They were fed *ad libitum* with a standard AIN-93N diet with 200 g/kg soy protein as a protein source to allow appropriate level of essential amino acids in the diet. After surgery, collagen 10g/kg (₃OVX10 and ₆OVX10) or 25g/kg (₃OVX25 and ₆OVX25) was added in the food at the expense of the same amount of soy (Table 1). The monitoring of diet consumption showed an intake of about 3.5 g/day thus these concentrations correspond to an ingestion of approximately 1 g/kg body weight of hydrolyzed collagen for OVX10 and 2.5 g/kg for OVX25. Less than 1% of the natural isoflavone content was still present in the soy protein used to prepare the diet.

The second experiment included 7 groups of 10 mice fed a collagen supplemented diet for 12 weeks and was designed i) to evaluate the effect of 4 additional weeks of collagen supplementation (25 g/kg food) given before the OVX procedure ii) to study if the way collagen was given (in the in the food vs by gavage) can modulate its effect and iii) to compare the effect of collagen to the effect of raloxifen, a pharmaceutical product commonly indicated for osteoporosis. Two groups of mice were sham-operated (SHAM) and 5 groups were ovariectomized at 3 months (OVX). They were fed *ad libitum* with a standard AIN-93N diet containing 140 g/kg casein as a protein source (previous experiment done in our laboratory shown no difference for any parameter between OVX mice feed with the soy or casein diet). One SHAM and one OVX group received the control diet throughout. The second SHAM group and 2 groups of OVX mice received a diet in which 25 g/kg of hydrolyzed collagen had been added at the expense of casein (SHAM25, OVX25) (Table 1); One OVX group receiving the collagen 4 weeks before surgery (OVX25-4W) the other receiving the collagen only after surgery (OVX25). Of the two remaining OVX groups, one received the hydrolyzed

collagen per gavages (OVX25-G) in amounts adjusted to the collagen intake of the OVX25 group and the last received raloxifene (1mg/kg) (OVXR) and was used as a positive control (OVXR).

At the end of both experiments, i.e. 26 and 12 weeks after surgery, mice were anesthetized blood samples were collected by cardiac puncture and immediately aliquoted on EDTA, and centrifuged. Plasma was stored at -80°C until assays. Body composition was determined by dissection. Three white adipose tissue (WAT) pads (retroperitoneal, mesenteric and total subcutaneous) were removed and weighed. The liver, intestines, uterus, brown adipose tissue and carcass (muscles and skeleton) were also weighed. Femurs were collected, cleaned from muscle and stored at -80°C.

Food intake recording

Daily food intake analysis was performed 10 weeks after OVX using metabolic cages designed in the laboratory and equipped with weighed food cups (sensitivity < 0.05 g). Spontaneous physical activity (SPA) was recorded by means of an activity platform placed below the cages (sensitivity < 1g). Data acquisition was performed throughout the day-light cycle and was controlled by a computer running a program developed specifically for the laboratory. Data were recorded at 100 Hz, averaged and stored at 5-s intervals for subsequent analysis.

Bone Mineral Density quantification

At week 0, 4, 8, 13 and 26 after the surgery for experiment 1 and at week 0, 2, 4, 8 and 12 after the surgery for experiment 2, bone mineral density (BMD) was measured by DXA with a Lumar Piximus densitometer (GE Medical Systems, software version 1.4 X lunar). The Piximus allows automated, accurate and precise measurement of bone density for small animals (10-50 g). The bone measurements exhibit excellent correlation with their ash or chemical extraction weights ($r=0.99$). The mice were weighed, anesthetized with ketamine (100 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg), and placed prone under the X-ray of the Lumar Piximus. BMD was measured for the whole body (excluding head and tail to improve sensitivity as suggested by the manufacturer), lumbar spines and the right femoral bone of each mouse [21].

Bone composition, geometric and biomechanical parameters

The mechanical properties of the mouse femurs were assessed by a three-point bending test using a Universal Testing Machine (Instron 4501, Instron, Canton, MA, USA). Each femur was centrally loaded at the mid-diaphysis at a speed of 1 mm/s. The extrinsic biomechanical parameters of stiffness (S , N/mm) and ultimate strength (F_u , N) were determined from load-displacement curves. The intrinsic biomechanical parameters Young's modulus (E , MPa) and ultimate stress (σ_u , MPa) were calculated from the load displacement curves and geometric properties as described previously [22]. The cross-sectional geometry of the diaphysis of each mouse femur was imaged by micro-computed tomography (μ CT, Skyscan 1072, Skyscan, Kontich, Belgium). Both medio-lateral and antero-posterior external and internal diameters of the cortical bone were measured at the mid-diaphysis. Cross-sectional cortical

area (CSA, mm²) and moment of inertia (I, mm⁴) in relation to the horizontal axis were calculated as previously described [23].

CTX concentrations in plasma

C-terminal telopeptide of type I collagen (CTX) concentration was measured in blood using an ELISA RatLaps™ kit (Osteomedical).

Statistical analysis

Statistical analyses were carried out using SAS version 9.1 with the data expressed as means ± SD. One-way ANOVA was performed using the GLM procedure of SAS with a Duncan multiple comparison test and a Tukey test *post hoc*. The MIXED procedure was used to perform repeated-measures ANOVA.

RESULTS

Body weight, body composition and food intake

In experiment 1 (Table 2), the OVX procedure reduced uterine weight when it was realized on 3-month-old mice. This phenomenon was not observed when OVX was performed on 6-month-old mice probably because of a natural uterus atrophy in 6-month-old sham ovariectomized mice (0.136 ± 0.020 vs. 0.183 ± 0.048 g, respectively $P < 0.05$). Final body weight was also larger only in the ₃OVX but not in the ₆OVX mice. In contrast, all OVX mice had significantly higher perirenal and subcutaneous adipose tissue pad mass than SHAM mice (table 2). No difference was observed between SHAM and OVX mice for carcass and kidney weights (data not shown).

In experiment 2 the design was similar to a previous one [19]. All the OVX mice, regardless of their treatment, had a significantly lower uterine weight than the SHAM mice. Collagen given in the diet (OVX25 and OVX25-4W) prevented the OVX-induced increase in body weight but not the increase in body fat. Collagen given by gavages (OVX25-G) did prevent neither the increase in body weight nor the increase in body fat. Raloxifen (OVXR) prevented the increase in both body weight and body fat. No differences were observed between groups for carcass and kidney weight (data not shown).

To explain why OVX mice gained more weight than the SHAM one we recorded food intake and spontaneous physical activity. Food intake analysis showed that OVX mice ate less compared with SHAM and were less active (Figure 1) but that the decrease in food intake was divided between day and night while the decrease in activity was limited to the night period. Assuming that activity represents 10-15% of total energy expenditure in caged mice, the decrease in spontaneous activity would have reduced energy requirements by only 2-3% while food intake was reduced by 10-15%. Thus, to explain the increased BW gain and body adiposity of the OVX mice, it is necessary to consider that OVX decreased resting metabolism by at least 15% or that part of the food energy was lost in feces.

Influence of ovariectomy and collagen ingestion on BMD

In experiment 1, surgery was performed either at 3 months when BMD was still increasing as in our previous study [19], or at 6 months when BMD had reached its maximal value.

BMD of 3-month-old OVX mice (Fig. 2A) increased during the first 13 weeks and then remained stable for the next 13 other weeks. The OVX procedure reduced BMD throughout the study. Collagen ingestion could not prevent a transient decrease in BMD (weeks 4 and 8) but allowed a progressive recovery after 13 weeks in OVX25 mice and 26 weeks in OVX10 mice.

OVX performed on 6-month-old mice (Fig. 2B) decreased BMD until the 13th week after the surgery, but the decrease was no more significant after 26 weeks. In collagen-treated mice, either OVX10 and OVX25, the decrease in BMD was less pronounced than in untreated mice and BMD was never significantly lower than in sham-operated mice. After 26 weeks, BMD was significantly higher in OVX25 than in OVX mice.

In experiment 2, collagen (25g/kg of diet) did not affect BMD in the SHAM group (SHAM vs SHAM25) and the effect of collagen on BMD in OVX mice was not affected by the mode of delivery (OVX25 vs OVX25-G). Consequently, for sake of clarity, figure 2C includes only the SHAM, OVX25, OVX25-4W and OVXR groups. As in experiment 1, collagen (25g/kg) given post-surgery, could not prevent a transient decrease in BMD, but allowed its recovery after 12 weeks. Interestingly, the protective effect of collagen on BMD was greatly improved by pre-treatment of the mice 4 weeks before OVX in such a way that in these mice, the decrease in BMD was delayed (4 weeks) and transient; BMD had recovered after 8 and 12 weeks. Treatment with raloxifen prevented the effect of OVX throughout the period.

Bone resorption

In experiment 1, the bone turnover marker CTX was assayed in mice plasma at the end of the experiment (26 weeks after the OVX procedure). OVX increased plasma CTX whether it was performed at 3 or 6 months. In both conditions ingestion of 10 or 25 g/kg of Collagen prevented this increase. However the OVX procedure induced a more important CTX increase when performed on 6-month-old mice

In experiment 2, plasma CTX was measured 12 weeks after surgery. OVX increased significantly plasma CTX and this increase was prevented by all collagen treatments. No significant differences were observed between treatments.

Bone mechanical properties

In experiment 1, an evolution of the biomechanical parameters can be noticed between 3- and 6-month-old SHAM-operated mice. ₆SHAM mice had a significantly higher moment of inertia, F_u and cross sectional area (CSA) than ₃SHAM (Table 3). Evaluation of femur mechanical properties for ₃SHAM and ₃OVX mice showed no significant differences between groups neither for intrinsic parameters such as ultimate stress, Young's modulus and stiffness (Table 3), nor for extrinsic parameters such as F_u and

the moment of inertia. CSA was decreased by ovariectomy and this decrease was prevented by collagen in both 3 and 6 months OVX mice. Stiffness and Fu were not affected when OVX was performed at 3 weeks, but decreased when OVX was performed at 6 Weeks. Only collagen 25g/kg supply allowed restoring these parameters.

DISCUSSION

Two different models were used to study the effect of collagen ingestion on bone quality. The OVX procedure was realized either on 3-month-old mice when BMD was still increasing or on 6-month-old mice when BMD had reached its maximal value as shown previously [24].

In both models, untreated OVX animals had higher body fat and lower BMD compared to SHAM. Analysis of food intake and activity of SHAM and OVX mice showed that the increased body fat observed for OVX mice was not related to an increase in food intake and thus would result from a decrease of resting energy metabolism or a defective intestinal absorption of food energy. In contrast, OVXR mice did not gain fat compared to SHAM and as the amount of food ingested was the same as for OVX this result would indicate that the OVXR mice were more active and/or had a higher resting metabolism and/or did not suffer impaired energy absorption. Raloxifen has been shown to maintain both trabecular and cortical microarchitecture and BMD and to prevent bone loss due to oestrogen deficiency [25, 26, 27] but in this study, it did not prevent uterus atrophy of 3-month-old mice

BMD results showed that 4 weeks after the OVX procedure the differences between SHAM and OVX are more important for mice ovariectomized at 3 months than for those ovariectomized at 6 months. Moreover 6 months after the OVX procedure the difference between OVX and SHAM was still significant when mice had been ovariectomized at 3 months but the difference was no more significant for mice ovariectomized at 6 months. Those results show that in mice bone cell sensitivity to estrogen deficiency is different, leading to various bone loss patterns, according to the developmental stages. In this C3H mouse model when the ovariectomy was performed at 12 weeks when BMD was still increasing we measured, two week after surgery, a BMD decrease suggesting that the more important bone modifications are observed just after the estrogens withdrawal. According to different studies, osteogenesis is regulated by ovariectomy duration resulting in a fast regulation of bone formation gene expression. This regulation allows protection against bone loss induced by ovariectomy [28, 29] until exhaustion of the osteogenesis process. Thus, the ovariectomy procedure induced a negative long-term regulation of bone formation leading to a predominance of bone resorption over bone formation.

. In addition, for mice which undergone surgery at 6 months, the same uterine weight is reported 6 months after the OVX procedure for ₆OVX compared to ₆SHAM. We thus report a natural uterine atrophy as a function of time for C3H mice which may explain why there were no BMD differences between Sham and OVX mice six months after surgery for mice ovariectomized at 6 months. However collagen ingestion is still able to improve the bone deterioration induced by the OVX procedure. Although, the BMD is stable from 6 to 12 months, and some other bones biomechanical properties such as the moment of inertia, Fu and CSA are still increasing from 9 to 12 months.

Taken together, these results show that collagen ingestion significantly improved bone parameters. Femur biochemical parameters were significantly lower for OVX compared with SHAM and collagen ingestion was able to restore these parameters. Accordingly OVX25 mice had higher CSA and stiffness than OVX but when a lower concentration of collagen was added to the diet (10g/kg diet), the CSA increase was not significant. As the stiffness of bone is correlated to the amount of type I collagen [30, 31], and since previous studies showed an increase of type I collagen and proteoglycan excretion when mice ingested hydrolyzed collagen [18], this last result would show that intake of hydrolyzed collagen increases the formation of collagen type I in bone. We noticed a general evolution of bone mechanical properties as function of time for mice, characterized by bone growth and bone strength improvement. These results show that bone structure is still developing even when mouse growth phase is over. At 6 months BMD reached its maximal value and the OVX procedure induced a BMD loss which is related to the estrogen deficiency but, as previously reported by Ly et al. [32], genetic factors also modulate bone metabolism to restore bone metabolism after ovariectomy. These results indicate that when the OVX procedure is performed on 6-month-old mice the model may better mimic menopause. Analysis of CTX plasma level 12 weeks after surgery showed that collagen ingestion also reduced CTX plasma level, suggesting that hydrolyzed collagen decreased bone resorption. These results are in good agreement with our previous observations [19] and suggest that hydrolyzed collagen, whether it is given in the food or added by gavage, acts on bone metabolism independently of the main source of protein in the diet.

In contrast, and interestingly, early supply of collagen one month before surgery prevented the decrease in BMD observed 2 weeks after the OVX procedure for 3-month-old ovariectomized which makes this way of nutritional treatment as efficient as the addition of Raloxifene, a selective oestrogen receptor modulator (SERM). These results can indicate that hydrolyzed collagen intake could have a preventive role on bone metabolism before the beginning of bone loss due to menopause when referring to humans. Also, the final CTX plasma level for OVX25-4W was significantly lower than in OVX mice while we observed no significant difference for CTX values between the different groups fed with 25g/kg hydrolyzed collagen diet (pOVX25 , OVX25 , gOVX25). More studies are needed to explain the mechanisms of the preventive effect of hydrolyzed collagen given before surgery on BMD loss, but these results are in good agreement with our previous study which showed a direct action of collagen on osteoclasts to inhibit their differentiation in vitro. Moreover the effect persists as long as collagen is ingested.

In conclusion this study is in good agreement with our previous work which showed that hydrolyzed collagen has an effect on bone resorption factors and further demonstrates that anticipated collagen ingestion can prevent the decrease in BMD as efficient as raloxifene which has been shown to be the more effective agent to improve the mechanical properties of bones in OVX mice [25]. These results support the potential interest of hydrolyzed collagen as a nutritional complement to prevent bone loss of those women at high risk for enhanced post-menopausal bone loss

BIBLIOGRAPHY

1. Omi N, Ezawa I (1995) The effect of ovariectomy on bone metabolism in rats Bone 17:163S-168S
2. Ammann P, Rizzoli R (2003) Bone strength and its determinants Osteoporos Int 14:S13-18.
3. Burr DB (2002) The contribution of the organic matrix to bone's material properties Bone 3:8-11.
4. Currey JD (2001) Bone strength: what are we trying to measure? Calcif Tissue Int 68:205-210.
5. Seeman E, Delmas PD (2006) Bone quality--the material and structural basis of bone strength and fragility N Engl J Med 25;354: 2250-2261.
6. Turner CH (2006) Bone strength: current concepts Ann N Y Acad Sci 1068:429-46.
7. Peters BS, Martini LA (2010) Nutritional aspects of the prevention and treatment of osteoporosis Arq Bras Endocrinol Metabol 54:179-185.
8. Bonjour JP (2005) Dietary protein: an essential nutrient for bone health J Am Coll Nutr 24: 526S-536S.
9. Kerstetter JE, O'Brien KO, Insogna KL (1998) Dietary protein affects intestinal calcium absorption Am J Clin Nutr 68:859-865
10. Lips P, Bouillon R, van Schoor NM, Vanderschueren D, Verschueren S, Kuchuk N, Milisen K, Boonen S. (2010) Reducing fracture risk with calcium and vitamin D Clin Endocrinol 73:277-285
11. Thissen JP, Ketelslegers JM, Underwood LE (1994) Nutritional regulation of the insulin-like growth factors Endocr Rev 15: 80-101.
12. Schürch MA, Rizzoli R, Slosman D, Vadas L, Vergnaud P, Bonjour JP (1998) Protein supplements increase serum insulin-like growth factor-I levels and attenuate proximal femur bone loss in patients with recent hip fracture A randomized, double-blind, placebo-controlled trial Ann Intern Med, 128: 801-809.
13. Barzel, US (1995) The skeleton as an ion exchange system: implications for the role of acid-base imbalance in the genesis of osteoporosis J Bone Miner Res 10: 1431-6.
14. Barzel, U.S. and L.K. Massey (1998) Excess dietary protein can adversely affect bone. J Nutr 128: 1051-1053.
15. Moskowitz RW (2000) Role of collagen hydrolysate in bone and joint disease Semin Arthritis Rheum 30: 87-99.
16. Koyama Y, Hirota A, Mori H, Takahara H, Kuwaba K, Kusubata M, Matsubara Y, Kasugai S, Itoh M, Irie S (2001) Ingestion of gelatin has differential effect on bone mineral density and body weight in protein undernutrition. J Nutr Sci Vitaminol 47: 84-86.
17. Wu J, Fujioka M, Sugimoto K, Mu G, Ishimi Y (2004) Assessment of effectiveness of oral administration of collagen peptide on bone metabolism in growing and mature rats. J Bone Miner Metab 22: 547-553.
18. Nomura Y, Oohashi K, Watanabe M, Kasugai S (2005) Increase in bone mineral density through oral administration of shark gelatin to ovariectomized rats Nutrition 21: 1120-1126.
19. Guillerminet F, Beaupied H, Fabien-Soulé V, Tomé D, Benhamou CL, Roux C, Blais A (2010) Hydrolyzed collagen improves bone metabolism and biomechanical parameters in ovariectomized mice: an in vitro and in vivo study. Bone 46: p.827-834.
20. Ohara H, Matsumoto H, Ito K, Iwai K, Sato K (2007) Comparison of quantity and structures of hydroxyproline-containing peptides in human blood after oral ingestion of gelatin hydrolysates from different sources. J Agric Food Chem 21;55: 1532-1535.
21. Nagy TR, Clair AL (2000) Precision and accuracy of dual-energy X-ray absorptiometry for determining in vivo body composition of mice. Obes Res 8: 392-398.
22. Turner CH, and Burr DB (1993) Basic biomechanical measurements of bone: a tutorial. Bone 14: 595-608.
23. Di Masso RJ, Font MT, Capozza RF, Detarsio G, Sosa F, Ferretti JL (1997) Long-bone

- biomechanics in mice selected for body conformation. *Bone* 20: 539-45.
24. Blais A, Malet A, Mikogami T, Martin-Rouas C, Tome D (2009) Oral bovine lactoferrin improves bone status of ovariectomized mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 296: E1281-E1288.
 25. Cano A, Dapía S, Noguera I, Pineda B, Hermenegildo C, Del Val R, Caeiro JR, García-Pérez MA (2008) Comparative effects of 17β -estradiol, raloxifene and genistein on bone 3D microarchitecture and volumetric bone mineral density in the ovariectomized mice *Osteoporos Int* 19: 793-800.
 26. Sliwiński L, Folwarczna J, Nowińska B, Cegięła U, Pytlik M, Kaczmarczyk-Sedlak I, Trzeciak H, Trzeciak HI (2009) A comparative study of the effects of genistein, estradiol and raloxifene on the murine skeletal system. *Acta Biochimica Polonica* 2: 261-270
 27. Jochems C, Lagerquist M, Håkansson C, Ohlsson C, Carlsten H (2008) Long-term anti-arthritic and anti-osteoporotic effects of raloxifene in established experimental postmenopausal polyarthritis *Clin Exp Immunol* 152: 593-597
 28. Schroeder TM, Jensen ED, Westendorf JJ (2005) Runx2: a master organizer of gene transcription in developing and maturing osteoblasts. *Birth Defects Res C Embryo Today* 75: 213-25.
 29. Marie PJ (2008) Transcription factors controlling osteoblastogenesis. *Arch Biochem Biophys* 473: 98-105.
 30. Burr, D.B (2002) The contribution of the organic matrix to bone's material properties. *Bone*, 2002. 31(1): p. 8-11.
 31. Mann V, Hobson EE, Li B, Stewart TL, Grant SE, Robins SP, Aspden RM, Ralston SH. A COL1A1 Sp1 binding site polymorphism predisposes to osteoporotic fracture by affecting bone density and quality. *J Clin Invest*, 2001. 107(7): p. 899-907.
 32. Li CY, Schaffler MB, Wolde-Semait HT, Hernandez CJ, Jepsen KJ. Genetic background influences cortical bone response to ovariectomy (20056) *J Bone Miner Res* 20: 2150-2158.

Legend to figures

Figure 1: Daily food intake analysis (**A**) and spontaneous physical activity (**B**) of SHAM (black) and OVX mice (grey) of the second experiment performed 10 weeks after the OVX procedure. Values are means \pm SD, n = 8. Groups with different letters are significantly different ($p < 0.05$).

Figure 2: Bone mass density (BMD) of whole body 26 weeks after ovariectomy for 3-month-ovariectomized mice (**A**) and 6-month-ovariectomized mice (**B**) under soy main protein diet. BMD was evaluated for SHAM^s (hatched), OVX (white), OVX10 (grey) and OVX25 (black) mice. Values are means \pm SD, n = 8. Groups with different letters are significantly different ($p < 0.05$). **C:** Evolution of Bone mass density (BMD) of whole body 2, 4, 8 and 12 weeks after ovariectomy for 3-month-ovariectomized mice under casein main protein diet. BMD was evaluated for SHAM (hatched), OVX (white), gOVX25 (grey), pOVX25 (black), and OVXr (small squares) mice. Values are means \pm SD, n = 10. Groups with different letters are significantly different ($p < 0.05$).

Figure 3: A: CTX plasma concentration 26 weeks after ovariectomy. CTX was evaluated for 3-month-ovariectomized mice (black) and 6-month-ovariectomized mice (grey) under soy main protein diet. Values are means \pm SD, n = 8. Groups with different letters are significantly different ($p < 0.05$). **B:** CTX plasma concentration 12 weeks, after ovariectomy for 3-month-ovariectomized mice under casein main protein diet. CTX was evaluated for 3-month-ovariectomized mice under casein main protein diet. Values are means \pm SD, n = 10. Groups with different letters are significantly different ($p < 0.05$).

Figure 1

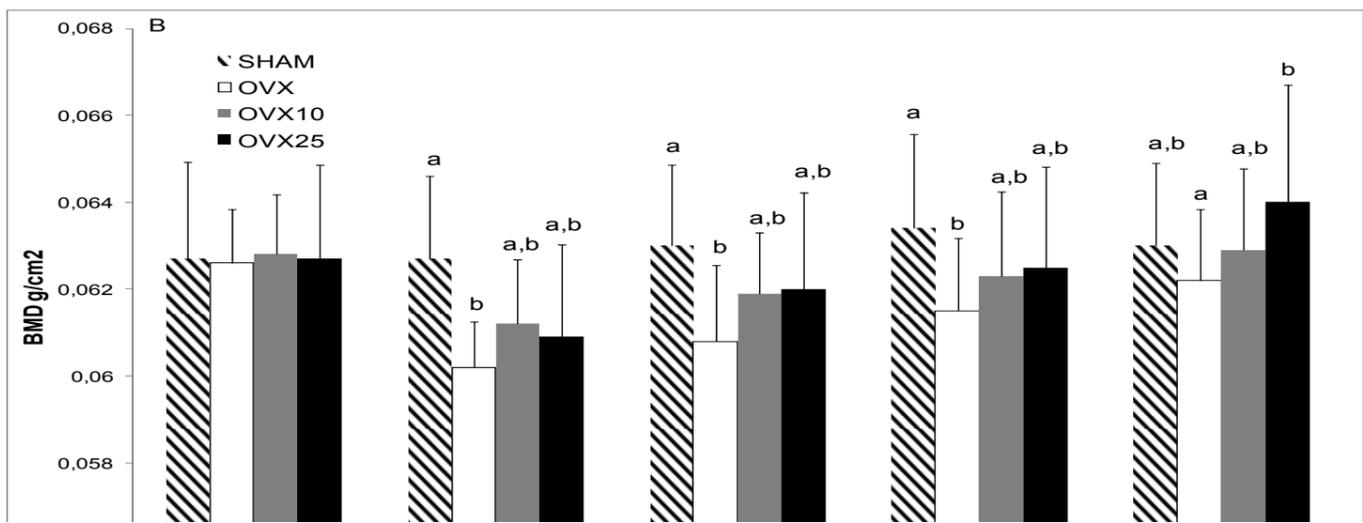
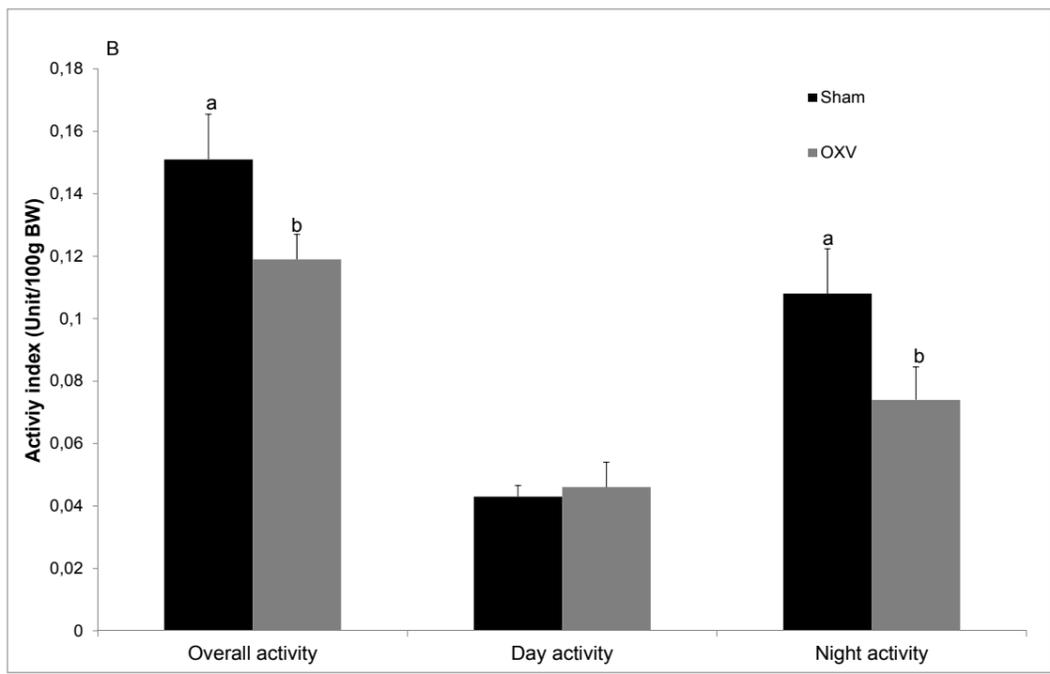
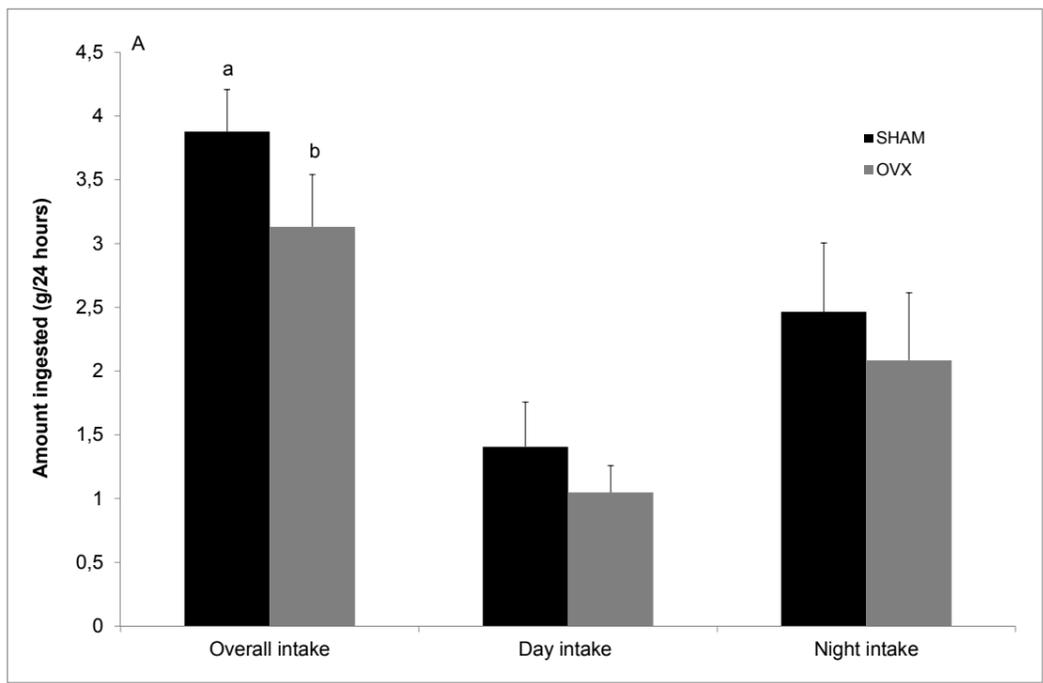


Figure 2A surgery at 3 months and 2B surgery at 6 months

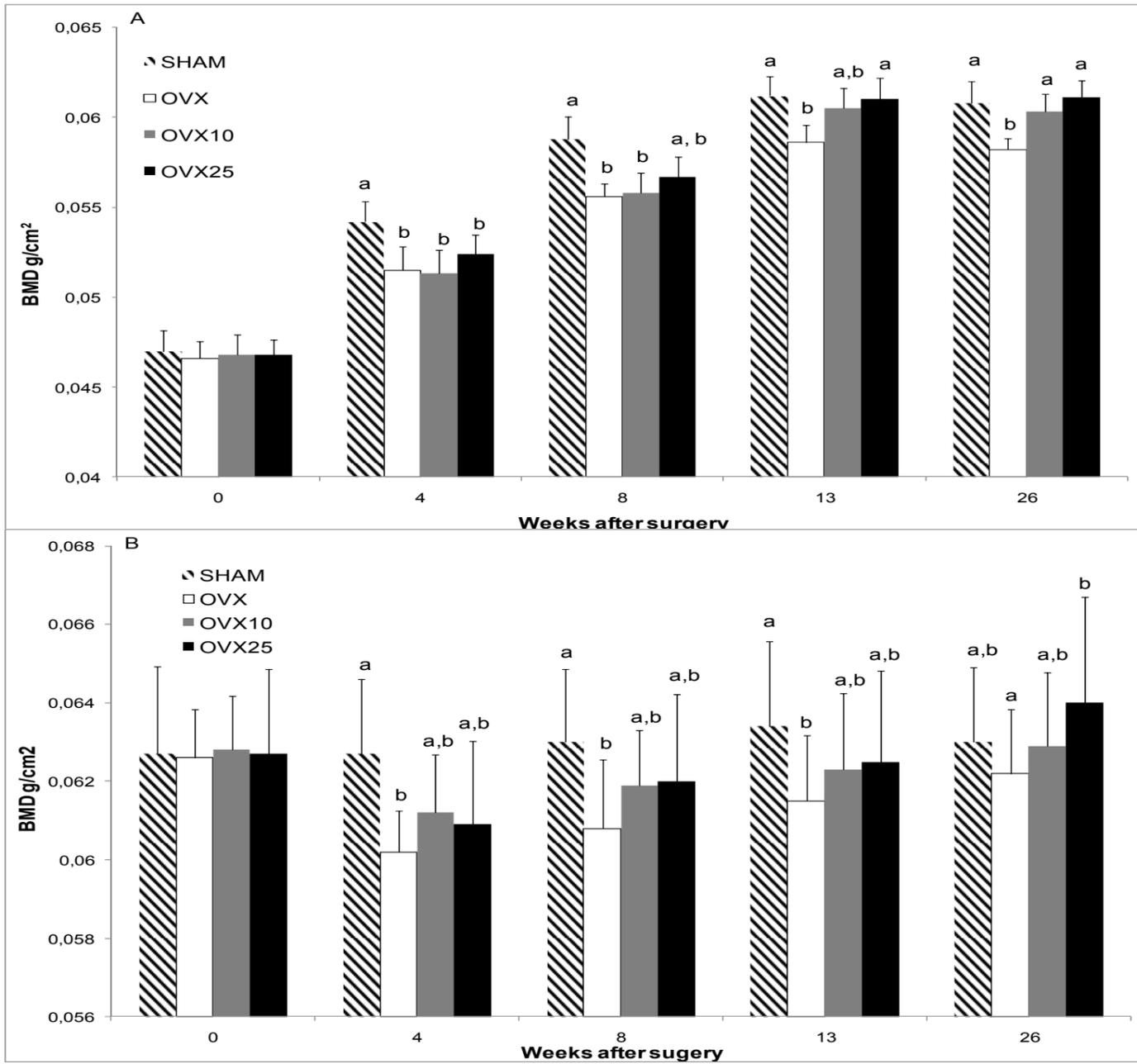
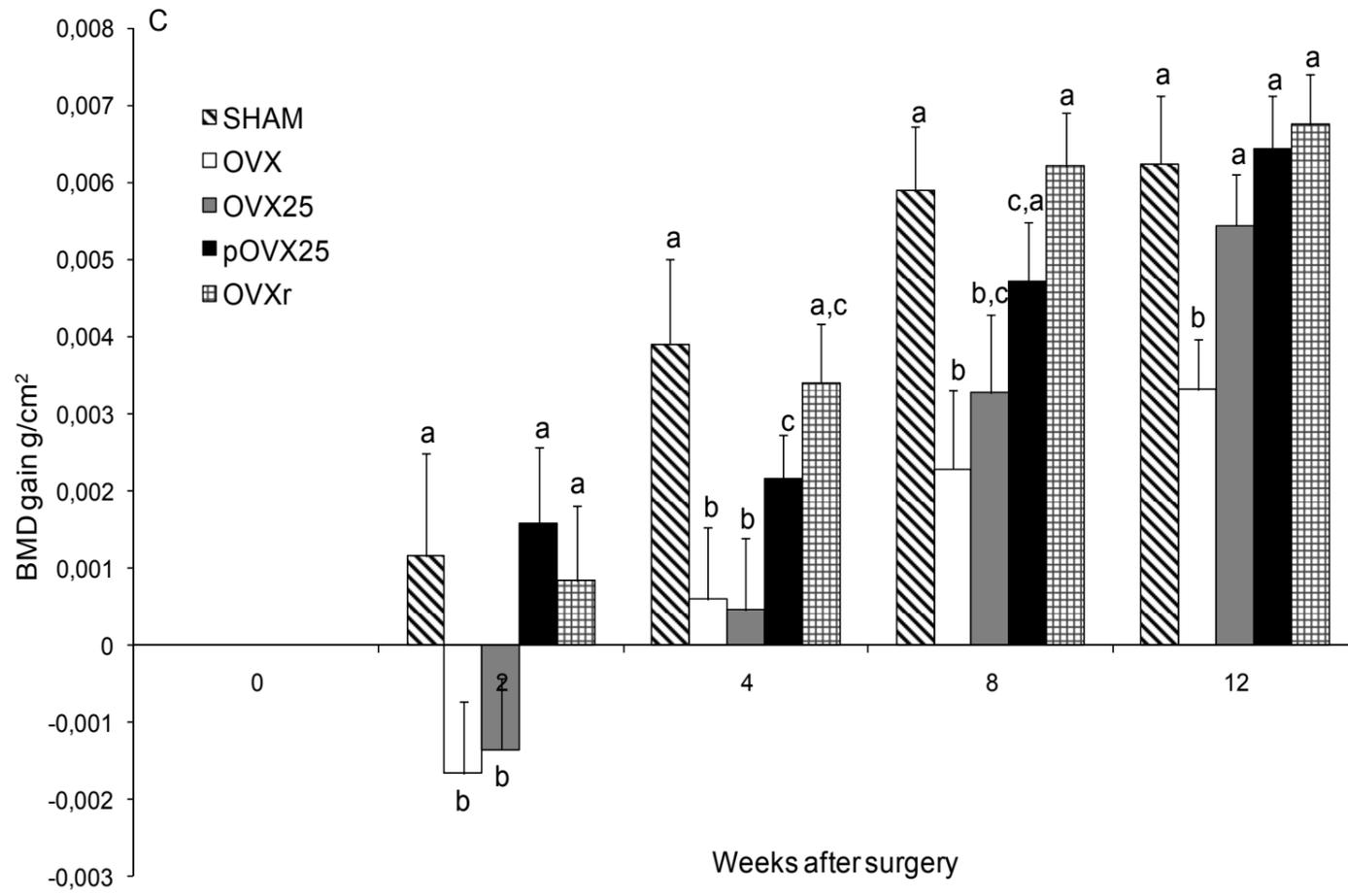


Figure 2C surgery at 3 months



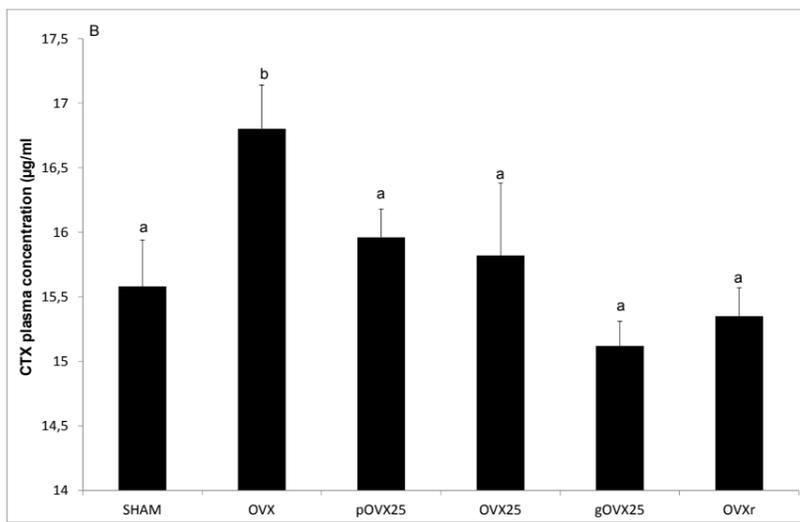
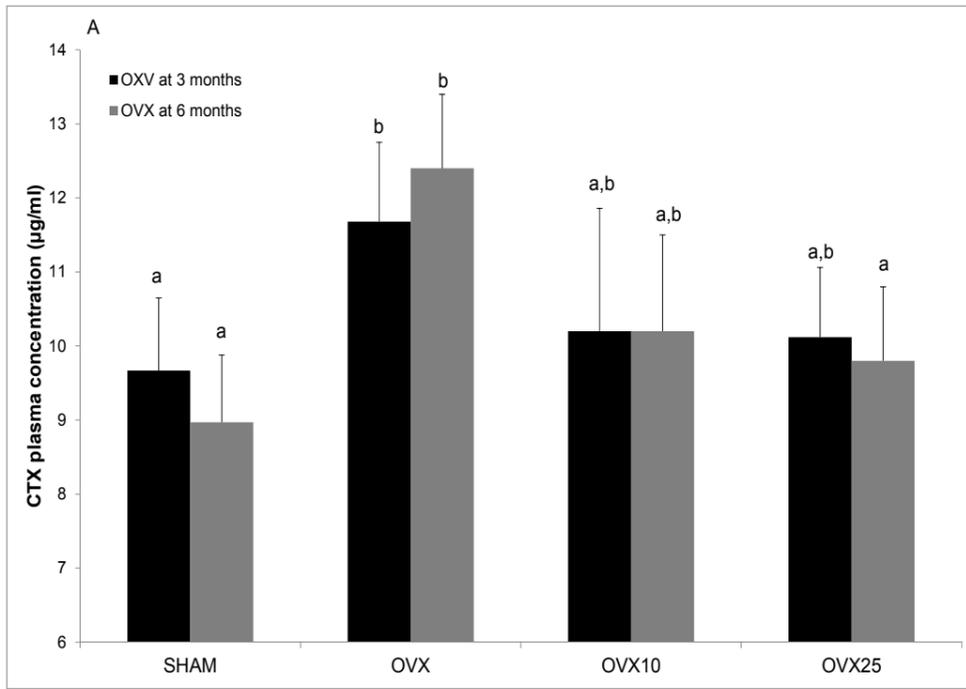


Figure 3

Table 1

Design of the animal studies

	Number of mice	OVX/SHAM	Age at surgery (months)	Dietary protein source	Diet complementation (g/kg diet)	Collagen intake	Duration of the experiment (week)	Denomination
Experiment 1 : 64 mice	8	OVX	3	soy	-	-	26	₃ OVX
	8	OVX	3	soy	Collagen (10)	<i>ad libitum</i>	26	₃ OVX10
	8	OVX	3	soy	Collagen (25)	<i>ad libitum</i>	26	₃ OVX25
	8	OVX	6	soy	-	-	26	₆ OVX
	8	OVX	6	soy	Collagen (10)	<i>ad libitum</i>	26	₆ OVX10
	8	OVX	6	soy	Collagen (25)	<i>ad libitum</i>	26	₆ OVX25
	8	SHAM	3	soy	-	-	26	₃ SHAM
	8	SHAM	6	soy	-	-	26	₆ SHAM
Experiment 2 : 70 mice	10	OVX	3	casein	-	-	12	OVX
	10	OVX	3	casein	Collagen (25)	<i>ad libitum</i>	12	OVX25
	10	OVX	3	casein	Collagen (25)	<i>ad libitum</i> 4 weeks before OVX	12	OVX25-4W
	10	OVX	3	casein	Collagen (25)	gavage	12	OVX25-G
	10	OVX	3	casein	Roloxifene (0.001)	<i>ad libitum</i>	12	OVXR
	10	SHAM	3	casein	-	-	12	SHAM
	10	SHAM	3	casein	Collagen (25)	<i>ad libitum</i>	12	SHAM25

Table 2: Body composition of 3 and 6 month-old mice ovariectomized mice 26 weeks after surgery (experiment 1) and of 3 month-old ovariectomized mice 12 weeks after surgery (experiment 2). Values are means \pm SD, n = 8. Values in a column of the same group with different letters are significantly different (P<0.05).

Dietary Groups	Initial Body Weight (g)	Final Body Weight (g)	Uterus (g)	Mesenteric fat mass (g/gBW)	Perirenal fat mass (g/gBW)	subcutaneous fat mass (g)	Carcass (g)
Experiment 1							
3SHAM	20.43 \pm 0.95	41.90 \pm 3.62 ^a	0.183 \pm 0.048 ^a	0.779 \pm 0.109	0.754 \pm 0.218 ^a	3.371 \pm 0.631 ^a	12.09 \pm 0.55
3OVX	21.84 \pm 2.30	45.46 \pm 2.77 ^b	0.139 \pm 0.039 ^b	1.019 \pm 0.196	1.091 \pm 0.163 ^b	4.047 \pm 0.489 ^b	12.10 \pm 0.50
3OVX10	21.38 \pm 2.47	44.67 \pm 3.90 ^{ab}	0.127 \pm 0.040 ^b	0.923 \pm 0.147	0.912 \pm 0.201 ^b	3.984 \pm 0.648 ^b	11.94 \pm 0.40
3OVX25	21.72 \pm 1.65	44.05 \pm 3.48 ^{ab}	0.140 \pm 0.054 ^b	0.939 \pm 0.179	0.985 \pm 0.246 ^b	4.087 \pm 0.763 ^b	12.25 \pm 0.92
Experiment 2							
1							
6SHAM	28.01 \pm 3.04	38.79 \pm 4.89 ^a	0.136 \pm 0.020	0.910 \pm 0.233	0.918 \pm 0.440 ^a	3.674 \pm 0.764 ^a	11.54 \pm 1.01
6OVX	30.00 \pm 3.31	42.27 \pm 4.07 ^{ab}	0.124 \pm 0.021	1.299 \pm 0.380	1.784 \pm 0.330 ^b	4.852 \pm 0.788 ^b	12.46 \pm 0.91
6OVX10	29.81 \pm 2.94	46.85 \pm 4.94 ^b	0.121 \pm 0.019	1.309 \pm 0.344	1.840 \pm 0.329 ^b	5.634 \pm 0.737 ^b	12.92 \pm 1.67
6OVX25	30.31 \pm 3.33	47.45 \pm 5.87 ^b	0.122 \pm 0.031	1.427 \pm 0.281	1.772 \pm 0.321 ^b	5.359 \pm 0.317 ^b	12.15 \pm 1.15

Experiment							
2	25.14 ± 1.18	36.50 ±	0.253 ±	1.037 ±	0.780 ±	4.071 ±	11.37 ± 0.59
SHAM		2.34 ^a	0.041 ^a	0.177	0.183 ^a	0.643 ^a	
SHAM25	24.54 ± 1.18	35.45 ±	0.244 ±	1.004 ±	0.779 ±	3.781 ±	11.34 ± 0.73
		2.34 ^a	0.039 ^a	0.207	0.109 ^a	0.668 ^a	
OVX	24.20 ± 1.43	41.74 ± 2.49	0.131 ±	1.421 ±	1.197 ±	5.158 ±	12.87 ± 1.17
		b	0.029 ^b	0.334	0.223 ^b	0.681 ^b	
OVX25	24.75 ± 2.30	39.63 ± 3.65	0.144 ±	1.246 ±	1.077 ±	5.180 ±	11.60 ± 1.23
		ab	0.042 ^b	0.177	0.174 ^b	0.731 ^b	
pOVX25	25.05 ± 1.90	39.76 ± 3.67	0.140 ±	1.160 ±	1.045 ±	5.163 ±	11.87 ± 0.82
		ab	0.031 ^b	0.280	0.147 ^b	0.682 ^b	
gOVX25	25.26 ± 0.97	41.00 ± 2.49	0.151 ±	1.324 ±	1.212 ±	5.461 ±	12.72 ± 1.18
		b	0.038 ^b	0.132	0.214 ^b	0.694 ^b	
OVXr	24.32 ± 1.06	34.61 ±	0.127 ±	0.953 ±	0.751 ±	3.546 ±	11.84 ± 0.72
		2.87 ^a	0.028 ^b	0.213	0.144 ^a	0.734 ^a	

Table 3: Femur biomechanical parameters of 3 and 6 month-old OVX mice 26 weeks after the OVX procedure (experiment 1). Values are means \pm SD, n = 8. Values in a same column of the same group with different letters are significantly different (P<0.05). The star indicates significant difference between 3 and 6 month-old OVX mice (P<0.05).

Dietary Groups	Moment of inertia I (mm⁴)	Fu (N)	Ultimate stress σ_u (MPa)	CSA (mm²)	Young's modulus E (MPa)	Stiffness S (N.mm⁻¹)	Energy (N.mm)
₃Sham	0.19 \pm 0.03*	37.74 \pm 3.15*	269 \pm 24	1.47 \pm 0.01 ^{*a}	11071 \pm 1720	181 \pm 24	10.26 \pm 1.54
₃OVX	0.17 \pm 0.02	35.47 \pm 2.48	262 \pm 20	1.33 \pm 0.08 ^b	10252 \pm 1362	174 \pm 24	9.51 \pm 1.66
₃OVX10	0.19 \pm 0.02	36.29 \pm 2.77	259 \pm 21	1.44 \pm 0.10 ^{ab}	9985 \pm 1576	175 \pm 27	10.17 \pm 1.47
₃OVX25	0.20 \pm 0.03	38.52 \pm 2.60	263 \pm 32	1.46 \pm 0.14 ^a	9456 \pm 1637	176 \pm 19	10.61 \pm 2.77
₆Sham	0.27 \pm 0.04*	47.91 \pm 3.54 ^{*a}	254 \pm 27	1.74 \pm 0.13 ^{*a}	9928 \pm 1961	204 \pm 26 ^{ab}	11.43 \pm 2.33
₆OVX	0.24 \pm 0.02	42.16 \pm 3.74 ^b	258 \pm 21	1.55 \pm 0.12 ^b	9170 \pm 1305	186 \pm 19 ^b	11.27 \pm 2.93
₆OVX10	0.25 \pm 0.05	43.86 \pm 4.39 ^b	261 \pm 25	1.58 \pm 0.17 ^{ab}	9928 \pm 1961	175 \pm 27 ^b	10.17 \pm 1.47
₆OVX25	0.27 \pm 0.04	46.00 \pm 4.76 ^{ab}	257 \pm 21	1.67 \pm 0.17 ^a	9170 \pm 1305	227 \pm 13 ^a	12.79 \pm 1.87

DISCUSSION

L'objectif général de cette thèse était de confirmer l'effet de l'ingestion de collagène hydrolysé de type I sur la santé osseuse, et de déterminer les paramètres osseux impliqués. Pour cela, nous avons travaillé sur deux modèles d'étude : un modèle *in vitro* de culture cellulaire primaire qui nous permet de déterminer les réponses cellulaires, et un modèle *in vivo* sur modèle souris C3H/He ayant subi une ovariectomie.

Nos résultats démontrent que les peptides issus de l'ingestion de collagène hydrolysé augmentent l'ostéogenèse en modulant l'activité ostéoblastique, ce qui modifie les propriétés structurales de l'os. L'analyse au microscanner des fémurs révèle un changement morphologique de la zone corticale osseuse, qui améliore les propriétés biomécaniques de la structure osseuse, notamment sa résistance aux chocs. L'os fémoral présenterait donc un risque de fracture moindre.

Dans cette discussion, nous allons d'abord faire le point sur la mise en place de nos protocoles et modèles animaux, avant de discuter des résultats portant sur la prise alimentaire de collagène hydrolysé.

- Les propriétés structurales de la zone corticale osseuse évoluent au cours du temps.

Pour étudier l'effet du collagène hydrolysé sur le métabolisme osseux, nous avons choisi d'utiliser un modèle souris C3H/HeN ovariectomisées versus souris sham comme modèle d'ostéoporose post-ménopause. L'ablation des ovaires entraîne une chute hormonale au sein de l'organisme, ce qui nous permet de mimer une ménopause, et d'induire une perte osseuse artificielle. Des études précédentes ont montré une régulation génétique de la perte osseuse induite par une déficience en œstrogènes (Bouxsein et al., 2005 ; Li et al., 2005 ; Ward et al., 2005). Le modèle C3H/HeN a été choisi parce que cette souche de souris présente une densité osseuse élevée et que l'os cortical des fémurs de ces souris présente des zones de remodelage. A contrario, il serait intéressant de comparer le modèle choisi à un autre modèle de souris ayant une densité osseuse moindre comme les C57BL/6 (Voide et al., 2008).

- Evolution des propriétés structurales de la zone corticale osseuse sur un modèle souris C3H/HeN ayant subi une ovariectomie à 12 semaines.

A 12 semaines, la DMO est encore en train d'augmenter rapidement, l'ablation des ovaires induit donc une ostéoporose chez des souris en croissance. Ce phénomène n'est pas physiologique puisque l'on provoque une chute de densité osseuse importante au moment où la formation prime encore sur la résorption. Il permet cependant d'exacerber les réactions du métabolisme osseux face à des changements métaboliques induits par l'alimentation. Dans ce contexte, nous observons une chute de la masse osseuse 2 semaines après chirurgie chez les souris ayant subi une ovariectomie, suivie d'une prise de DMO moindre versus témoin. Le dosage des marqueurs osseux témoigne d'un déséquilibre du remodelage osseux en faveur de la résorption. Les souris sham ont une prise continue en DMO, reflet de la courbe de croissance osseuse moyenne chez la souris. Nos dosages de CTX montrent que chez les souris sham l'activité des ostéoclastes est significativement plus basse que chez les souris ayant subi une ovariectomie.

Cependant, même si on peut observer une baisse de certains paramètres biomécaniques tels que la résistance à la cassure ou l'aire de la zone corticale, nous n'observons pas de différence significative sur ces paramètres entre les souris ayant subi une ovariectomie et les souris sham .

- 12 semaines après chirurgie, les utérus prélevés sur les souris ayant subi une ovariectomie ont un poids significativement plus bas que ceux des souris sham, ce qui démontre l'efficacité de la chirurgie.

12 semaines post-chirurgie, la DMO des souris a atteint une phase de plateau, il n'y a donc plus de croissance osseuse. Les différences entre les shams et les souris ayant subi une ovariectomie s'amenuisent. Au niveau des marqueurs du métabolisme osseux, nous observons cependant toujours un plus faible taux de CTX pour les shams que pour les souris ayant subi une ovariectomie.

Notons que la dissection effectuée à 24 semaines après chirurgie montre que les utérus prélevés sur les souris sham ont le même poids que ceux prélevés sur les souris ayant subi une ovariectomie. Ce dernier résultat tend à montrer qu'il y a eu atrophie naturelle de l'utérus chez la souris à partir de 24 semaines.

- Evolution des propriétés structurales de la zone corticale osseuse sur un modèle souris C3H/HeN ayant subi une ovariectomie à 24 semaines.

A 24 semaines, les souris ont terminé leur phase de croissance, la DMO ne croît plus rapidement, même si une légère augmentation est toujours notable. Une ovariectomie à 24 semaines nous permet donc d'étudier les effets d'une chute hormonale sur le métabolisme osseux sur des souris dont le squelette est mature, et de comparer ce modèle à celui des souris en croissance.

Nous observons toujours un léger recul de la DMO 2 semaines après chirurgie, dû au stress opératoire. La DMO est significativement différente sur les témoins à cette date, et ce jusqu'à 12 semaines après opération. Cependant, nous n'observons pas de prise ou chute de DMO dans le temps pour les groupes témoins, et même si, au final, la DMO du groupe sham est en moyenne supérieure à celle du groupe de souris ayant subi une ovariectomie, nous n'observons pas de différence significative entre les témoins pour la DMO 24 semaines après chirurgie.

Au niveau des paramètres biomécaniques, nous pouvons observer une surface de zone corticale significativement plus élevée chez les souris sham par rapport aux souris ayant subi une ovariectomie. Cependant, nous n'avons pas d'effet significatif sur la force de cassure.

Pour résumer les prises dans le temps des bioparamètres osseux chez la souris C3H/HeN, nous pouvons spécifier que vers 12 semaines, les souris ont une BMD moyenne de $0,04 \text{ g/cm}^2$ environ. A la fin de la phase de croissance, la BMD atteint entre $0,06 \text{ g/cm}^2$ et $0,065 \text{ g/cm}^2$. La force nécessaire en newton pour briser le fémur des animaux est d'environ 30 N pour des animaux âgés de 24 semaines, et d'environ 35 N à 36 semaines. A 48 semaines, la force de cassure nécessaire est d'environ 45 N. Il y a donc une augmentation naturelle de la résistance à la cassure avec le temps chez la souris.

- L'ablation des ovaires provoque un changement de composition corporelle chez la souris, et un gain de poids plus important.

Les études de la composition corporelle de la souris opérée à 12 semaines confirment une prise de poids plus importante chez les souris ayant subi une ablation des ovaires, due à une prise en masse grasse plus importante au cours du temps, et mise en évidence par dissection 12 semaines post opération. Cette augmentation de la masse grasse se porte essentiellement sur la partie sous cutanée basse de la souris, et étonnamment sur le gras péri rénal.

Des études plus poussées de la consommation/dépense énergétique des souris ayant subi une ablation

des ovaires versus témoin seraient donc intéressantes à effectuer, en cage calorifique par exemple.

- La prise de collagène hydrolysé entraîne une augmentation de la formation osseuse de l'os.
- La prise de 25 g/kg de collagène augmente la zone corticale osseuse et l'élasticité fémorale des souris C3H/HeN ayant subi une ovariectomie à 12 semaines.

Notre première étude *in vivo* montre que l'ingestion de 25 g/kg de régime de collagène hydrolysé pendant 12 semaines chez la souris C3H/HeN ayant subi une ablation des ovaires à 12 semaines augmente de façon significative la BMD, la surface corticale ou la résistance à la cassure des fémurs. L'augmentation de la zone corticale osseuse chez ces souris est corrélée à une augmentation significative du diamètre externe du fémur et non à une modification de la zone médullaire de l'os, ce qui augmente la solidité de l'os et réduit son risque de fracture.

Ces derniers résultats sont en accord avec des études préalables montrant une corrélation entre la résistance à la cassure et le diamètre extérieur des os (Currey, 2001).

Les marqueurs du métabolisme osseux tels que le CTX nous montrent une baisse de la résorption osseuse. De plus, l'augmentation du diamètre externe des fémurs des souris alimentées avec des régimes enrichis en collagène hydrolysé traduit une augmentation du taux de formation osseuse. L'ingestion de collagène hydrolysé inhiberait donc la résorption osseuse induisant une augmentation du ratio formation/résorption du métabolisme osseux.

Pour le modèle souris C3H/HeN ayant subi une ovariectomie à 12 semaines, nous n'avons pas obtenu de différence significative sur les bioparamètres autres que la zone corticale (aire, diamètre et inertie) et la résistance à la cassure. Ainsi, nous n'avons pas noté de différence significative sur les propriétés intrinsèques de l'os, notamment sur le coefficient de raideur. En effet, les résultats obtenus dans cette étude montrent une tendance à une augmentation de ce paramètre (moyenne plus élevée versus témoin), mais aucun résultat n'est significatif.

L'ingestion de collagène hydrolysé induit des changements dans la structure géométrique de l'os, mais il ne change pas la qualité structurale de celui-ci.

Nous aurions pu attendre un changement pour le module de Young. En effet, des études préalables ont montré une corrélation entre la quantité de collagène de type I présent dans l'os et l'élasticité de celui-ci (Burr et al., 2002 ; Mann et al., 2001), ainsi qu'une augmentation de la formation de collagène de type I et de protéoglycanes dans la matrice osseuse des fémurs de souris nourris avec des régimes enrichis

en collagène hydrolysé (Koyama et al., 2005). Nos résultats sont en accord avec la littérature, puisque nous obtenons une quantification plus élevée des composés non minéraux de la matrice osseuse dans les tibias des souris, mais si l'élasticité de l'os tend à augmenter en moyenne, cette augmentation n'est pas significative.

Il serait donc intéressant dans la suite de ce travail de quantifier de façon plus précise la néoformation de collagène de type I dans l'os.

L'évaluation de l'activité de la phosphatase alcaline osseuse chez les souris ayant un régime enrichi en collagène hydrolysé montre que l'ingestion de collagène hydrolysé augmente le taux de formation osseuse de façon transitoire un mois après l'ovariectomie. Cependant, 12 semaines après chirurgie, les dosages plasmatiques de l'activité de la phosphatase alcaline osseuse chez les souris ayant un régime enrichi en collagène hydrolysé sont similaires à ceux du groupe témoin. Ces résultats pourraient suggérer que le collagène hydrolysé agit de façon rapide, voire temporaire, sur la formation osseuse. Cet effet permet en tout cas d'avoir une augmentation de la surface corticale, et donc une résistance plus élevée à la cassure, permanente.

- L'effet de l'ingestion de collagène hydrolysé n'est plus visible 24 semaines après l'opération.

- La prise de 25g/kg de collagène augmente la zone corticale osseuse et l'élasticité fémorale des souris C3H/HeN ayant subi une ovariectomie à 24 semaines.

Les résultats de la dissection des souris opérées à 24 semaines nous montrent un poids utérin similaire entre les souris OVX et les SHAM. Nous n'observons pas de différence sur la DMO entre les témoins, même si celle du groupe sham est légèrement supérieure à celle des souris ovariectomisées.

Les souris ingérant seulement 10 g/kg de régime de collagène hydrolysé ont une DMO similaire au témoin OVX à 12 et 24 semaines. Cependant, le groupe de souris ayant un régime supplémenté avec 25 g/kg de collagène hydrolysé a une DMO significativement supérieure au groupe témoin OVX.

Au niveau des autres paramètres biomécaniques, nous pouvons observer des différences significatives entre les témoins pour la surface corticale osseuse, et ce, même si nous ne voyons rien sur la DMO. En effet, la CSA est significativement plus basse pour les OVX que pour les SHAM.

La surface de la zone corticale est plus importante lorsque les souris ingèrent le régime incluant 25g/kg de collagène hydrolysé. Nous pouvons aussi remarquer un effet sur la raideur de l'os. Ce résultat confirme la tendance observée pour le modèle de souris opérées à 12 semaines, et sacrifiées 12

semaines après opération, où nous avons pu noter une augmentation de l'élasticité osseuse et une augmentation significative de la quantité des protéines de la matrice osseuse chez ces souris. Une quantification plus précise de la quantité de collagène de type I dans la matrice osseuse des fémurs de souris supplémentées en collagène hydrolysé devrait nous permettre d'aborder les mécanismes par lesquels l'ingestion du collagène module la physiologie osseuse. Les taux plasmatiques de CTX étant moindre pour les groupes supplémentés en collagène, la réduction de la résorption osseuse pour ces groupes pourrait aussi expliquer en partie les résultats obtenus.

- La prise aiguë ou continue de 25 g de collagène hydrolysé / kg de régime peut avoir un effet préventif sur la perte osseuse.

Nous avons travaillé sur un modèle souris C3H/HeN opérées à 12 semaines et sacrifiées à 8 semaines post opération afin d'étudier l'impact du moyen d'administration du collagène hydrolysé sur l'action de celui-ci.

Les résultats montrent que pour le groupe de souris recevant la dose de collagène hydrolysé par gavage, la prise de DMO et les taux plasmatiques en CTX sont similaires aux valeurs obtenues pour les souris recevant le collagène hydrolysé inclus dans la nourriture ; ce qui signifie qu'il n'y a pas d'influence du nombre de prises de collagène par jour sur l'action du collagène hydrolysé, et que la prise aiguë ou continue de celui-ci joue de façon similaire sur le métabolisme osseux.

Un groupe de souris a été supplémenté en collagène hydrolysé 4 semaines avant opération. Nous pouvons généralement observer une chute de la DMO chez les souris ayant subi une ovariectomie 2 semaines après opération, due à la chute hormonale brutale dans l'organisme de la souris. Les souris shams ne subissent donc pas de baisse importante de leur DMO, tout comme le groupe de souris supplémentées en raloxifène, utilisé dans cette expérience en contrôle positif, le raloxifène ayant un effet pharmacologique reconnu sur le métabolisme osseux (Cano et al., 2008 ; Leszek et al, 2009). Or, nous n'avons pas observé de recul de la DMO significatif pour le groupe de souris supplémentées en collagène hydrolysé 4 semaines avant l'ovariectomie. De plus, 8 semaines après la chirurgie, l'augmentation de la DMO pour ce groupe de souris est significativement plus importante que celle du groupe témoin ovariectomie, et similaire à celle du groupe SHAM et du groupe de souris supplémentées en raloxifène. La concentration finale en CTX est significativement plus faible que celle du groupe témoin ovariectomié. Ces résultats suggèrent que la prise de collagène hydrolysé aurait un effet préventif sur la chute du ratio formation/résorption du métabolisme osseux. En extrapolant chez

l'homme, le collagène hydrolysé pourrait donc avoir un effet préventif à l'apparition de l'ostéoporose.

- Les peptides issus de l'ingestion du collagène hydrolysé modulent l'activité ostéoblastique.

Nos résultats *in vitro* sur cultures cellulaires primaires de cellules osseuses montrent que les hydrolysats de collagène stimulent l'activité ostéoblastique. De plus, des observations générales des cellules (observation microscopique des cellules + zone de résorption sur pit assays) montrent une inhibition par les hydrolysats de collagène de l'activité ostéoclastique sans modifier la croissance de ceux-ci. Cet effet simultané de stimulation de l'activité des ostéoblastes et d'inhibition de l'activité de résorption des ostéoclastes conduit à une augmentation du ratio formation/résorption du métabolisme osseux.

Nos résultats *in vitro* corroborent les résultats *in vivo*, la présence de collagène hydrolysé augmente l'activité ostéoblaste et donc la formation osseuse, tout en inhibant l'activité de résorption des ostéoclastes. Ces modulations du métabolisme osseux induisent une croissance plus importante de la zone externe corticale de l'os.

Ces résultats nous permettent de conclure que les peptides issus de l'hydrolyse du collagène, de taille moyenne inférieure ou égale à 2 000 Da, modulent l'activité des cellules osseuses. De plus, nos travaux montrent une régulation dose-dépendante de l'activité ostéoblastique par ces peptides. Nous ne pouvons pas conclure si ces peptides interagissent directement avec un récepteur membranaire ostéoblastique, ou s'ils activent de manière indirecte les cellules en inhibant ou activant une autre molécule modulatrice de l'activité cellulaire osseuse.

- Les peptides issus de l'ingestion de collagène hydrolysé miment-ils l'action des peptides issus de l'hydrolyse de la matrice osseuse ?

Des études ont montré que la prise alimentaire de collagène de type I entraîne la présence dans le sang de peptides issus du collagène hydrolysé, similaires à ceux largués lors de la résorption du collagène de type I de la matrice osseuse, ces derniers ayant un rôle dans le métabolisme cellulaire osseux (Oesser et al., 1999 ; Iwai et al., 2005, Watanabe-Kamiyama, 2010).

L'activité ostéoblastique inclut trois étapes essentielles : la prolifération cellulaire, la synthèse de protéines matricielles (collagène de type I et protéoglycanes) et enfin la minéralisation de la matrice osseuse (par production d'hydroxyapatite) (Stein and Lian, 1993 ; Owen et al., 1991 ; Quarles et al., 1992).

Plusieurs hormones ou cytokines peuvent réguler la différenciation cellulaire et l'activité des ostéoblastes et ostéoclastes. Le TGF- β , stocké sous forme latente dans la matrice osseuse, est sécrété lors de la phase de résorption osseuse (Oreffo et al., 1989).

Le TGF- β stimule la production de collagène de type I et de protéoglycanes et inhibe en parallèle celle de l'hydroxyapatite. Le dérivé peptidique collagénique DGEA (asparagine, glycine, glutamine et alanine) interagit avec l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ localisée dans la membrane cellulaire ostéoblastique. Cette interaction entraîne l'inhibition de l'action du TGF- β et par conséquent induit la synthèse protéique de la matrice osseuse (Takeuchi et al., 1996 and 1997 ; Oesser et al. ; 1999, Xiao G et al., 1998). Les travaux de Nomura et al., 2005, montrent également que les dérivés peptidiques issus de l'ingestion de collagène hydrolysé sont capables d'augmenter la production de collagène de type I et de protéoglycanes.

Quel est le peptide actif issu de l'hydrolyse du collagène de type I qui module l'activité ostéoblastique ?

Une étude en double aveugle (Ohara et al., 1997) a comparé la quantité et la structure des dérivés d'hydrolysats de gélatine alimentaire de différentes origines (poisson et porc) dans le sang humain. Les quantités d'hydroxyproline libre ou de peptides contenant de l'hydroxyproline ont été estimées sur une période de 24 h. 30% de l'hydroxyproline détectée étaient sous forme peptidique. De plus, l'aire sous la courbe concentration peptidique en fonction du temps est plus importante pour les hydrolysats de poisson par rapport à ceux d'origine porcine. Le peptide retrouvé en plus grande concentration est Pro-Hyp. Lors de l'ingestion d'hydrolysats de poisson, les peptides Ala-Hyp, Leu-Hyp, Ile-Hyp, Phe-Hyp et Pro-Hyp-Gly sont retrouvés dans le plasma. Ala-Hyp-Gly et Ser-Hyp-Gly sont détectés seulement dans les hydrolysats obtenus à partir des écailles de poisson, ils ne sont pas retrouvés dans ceux obtenus à partir de la peau des poissons. La nature des peptides issus des hydrolysats retrouvés dans le sang dépend bien de l'origine du collagène, ce qui peut expliquer les différences de résultats obtenus *in vitro* entre l'effet des hydrolysats de collagène d'origine porcine, bovine ou piscicole.

Nos résultats montrent que l'effet des collagènes hydrolysés dépend non seulement de l'origine des hydrolysats mais aussi de leur poids moléculaire. En effet, les hydrolysats ayant un poids moléculaire moyen de 2000 Da augmentent plus efficacement l'activité ostéoblastique que les hydrolysats composés de peptides ayant un poids moyende 6000 Da, ce qui suggère que seuls des petits peptides issus du collagène hydrolysé peuvent interagir avec les cellules osseuses, et non l'ensemble de la protéine. De plus, le collagène a besoin d'être hydrolysé pour être capable d'interagir avec le métabolisme osseux.

Dans nos études *in vitro*, tous les hydrolysats testés ont eu un effet sur l'activité des ostéoblastes mais cet effet était plus important pour l'hydrolysats PCH-N (hydrolysats d'origine porcine à 2 000 Da). Nous

avons choisi, suite à ces expériences, l'hydrolysat PCH (hydrolysat d'origine porcine à 5 000 Da) pour nos études *in vivo*. Le collagène hydrolysé subissant une hydrolyse complémentaire pendant la digestion, un poids moléculaire plus important a été choisi.

Nos résultats obtenus *in vitro* sont en accord avec des études préliminaires montrant que le collagène de type I augmente la différenciation des lignées cellulaires ostéoblastiques MG-63 (Andrianarivo et al., 1992). Des résultats similaires ont été obtenus lorsque des ostéoblastes sont cultivées sur films de collagène de type I par rapport aux cultures classiques sur films plastiques. En effet, lorsque les cellules osseuses sont cultivées sur film de collagène, Lynch MP et al. (1995) montrent une amélioration de plusieurs marqueurs du métabolisme osseux dont la phosphatase alcaline et la minéralisation osseuse.

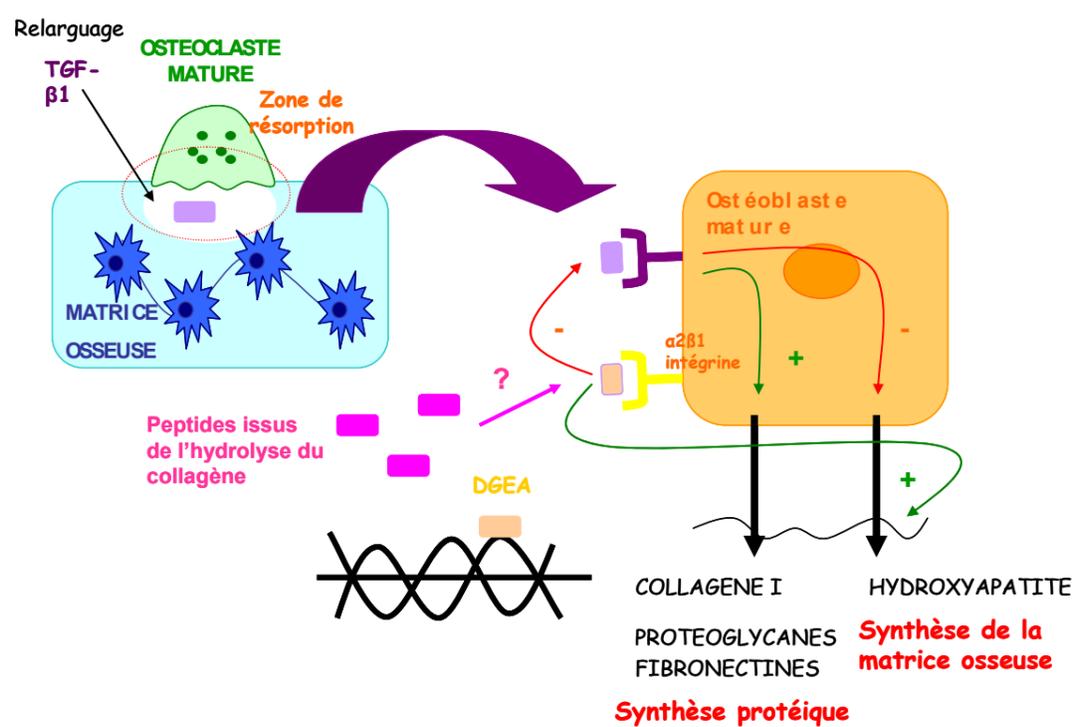


Figure 19 : Hypothèse de mécanisme d'action.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

L'objectif de cette thèse était de démontrer l'effet bénéfique du collagène hydrolysé sur la santé osseuse. Pour répondre à cette problématique, nous avons mis en place des modèles d'études *in vitro* et *in vivo*. Au cours de ces travaux, nous avons démontré l'effet modulateur des peptides issus de l'ingestion de collagène hydrolysé sur le métabolisme osseux, par activation des ostéoblastes et une certaine inhibition de l'activité ostéoclastique. En favorisant la phase de formation osseuse, le collagène hydrolysé ingéré inhibe la perte osseuse, augmente la résistance à la cassure des os en croissance et favorise l'élasticité des os matures. Nous avons aussi noté de façon intéressante que la prise de collagène hydrolysé a un effet préventif sur la perte osseuse.

Ces propriétés rendent intéressante cette protéine comme potentiel complément alimentaire.

Suite à ce travail et aux résultats obtenus, une étude clinique a été lancée en dehors du travail de thèse. Cette étude porte sur des femmes ménopausées recevant 10 g/jour de collagène hydrolysé versus placebo, sur une période 3 mois. Les résultats devraient être disponibles début 2011 et permettront de confirmer, ou non, l'effet bénéfique du collagène hydrolysé sur l'ostéoporose.

Il serait aussi intéressant de poursuivre ce travail de thèse. En effet, si nous avons pu mettre en évidence que la prise alimentaire du collagène hydrolysé influence de façon positive le métabolisme osseux, il reste maintenant à préciser le mécanisme d'action du collagène hydrolysé sur les cellules, en partant de l'hypothèse émise suite à notre travail. Nous n'avons pas quantifié certains éléments supplémentaires tels que les cytokines ou facteur de croissance (IL-6, IGF-1 etc) qui pourraient nous aider à identifier les mécanismes impliqués.

De plus, il serait important d'identifier le ou les peptides responsables des effets observés sur le métabolisme osseux. Les hydrolysats utilisés sont des mélanges peptidiques assez complexes dont nous ne connaissons pas la nature exacte, même si nous avons des informations générales. Connaître cette information permettrait de préciser le mécanisme d'action bien sûr, mais aussi de réduire les recommandations de prise qui sont actuellement à un équivalent de 10 g/j chez une femme d'environ 60 kg, ce qui correspond à plus de 10% des apports protéiques recommandés.

PROTOCOLE DE LA CULTURE CELLULAIRE :

Les cultures réalisées pour cette étude sont des cultures de cellules adhérentes obtenues par la méthode de dissection. De plus, les ostéoblastes et les ostéoclastes sont cultivés en monocouche et conjointement, car il est très difficile de les cultiver séparément.

Pour avoir une bonne homogénéité de densité cellulaire dans chaque puits de la plaque de culture et donc une meilleure reproductibilité des résultats, une pré-culture est réalisée dans des P 75 (flacon de 75 cm²) avant l'ensemencement de la plaque.

Les prélèvements doivent être réalisés de manière aseptique et tout le matériel utilisé doit être préalablement stérilisé.

Les souris sont décapitées à l'aide d'une paire de ciseaux. Ensuite, les pattes sont prélevées et placées dans la glace avant d'être préparées pour la mise en culture. Les cadavres doivent être conservés au congélateur avant leur incinération.

Avant de broyer les os, il faut enlever entièrement les muscles des pattes et les os sont immédiatement placés dans un peu de milieu de culture car, sous la hotte à flux laminaire, ils se dessèchent rapidement. Après cette étape, les os sont coupés dans le sens de la longueur en petits fragments afin que les cellules de la moelle osseuse se retrouvent dans le milieu de culture. Les fragments et le milieu sont ensuite récupérés dans un tube contenant du milieu de culture qui est ensuite agité activement. La suspension ainsi obtenue est filtrée à l'aide d'un cell strainer. Le cell strainer est un filtre qui retient les fragments osseux mais qui est perméable aux cellules. La suspension est ensuite centrifugée 5 minutes à 800 g pour récupérer un culot de cellules qui est re-suspendu dans un milieu de culture propre. La suspension ne contient pas seulement des précurseurs des ostéoblastes et des ostéoclastes, mais également des cellules non adhérentes comme des lymphocytes et des globules rouges. Pour éliminer les cellules non-adhérentes ainsi que les cellules mortes, il faut incubé pendant au moins 4 heures, c'est-à-dire le temps que les cellules adhérentes puissent se fixer aux parois du flacon et ensuite il faut remplacer le milieu de culture. Seulement 10 % des cellules de la suspension sont capables d'adhérer au support. Les cultures sont incubées à 37°C sous atmosphère humide contenant 5 % de CO₂.

Après 8 jours de culture, les cellules des pré-cultures doivent être décollées du flacon à l'aide d'un grattoir. Les densités cellulaires sont estimées en utilisant une cellule de Malassez afin de déterminer la dilution à réaliser pour obtenir une densité de $1,2 \times 10^4$ cellules/mL. Les fractions protéiques peuvent être ajoutées dès que les cellules nouvellement ensemencées ont adhéré au support. Les solutions de protéines sont préparées à une concentration de 10 mg/mL dans un milieu de culture avec 10% de SVF et stérilisées par filtration (sur filtre de 22 μ m). Durant toute la période de culture, les cellules sont observées tous les jours au microscope afin de vérifier qu'il n'y a pas de problème de contamination.

Pour réaliser des photos de nos cultures cellulaires, une coloration faisant apparaître les noyaux est réalisée. Elle permet de différencier les ostéoblastes plurinucléés des ostéoclastes ne possédant qu'un seul noyau.

Pour cela, il faut tout d'abord fixer les cellules à la boîte à l'aide de 300 μ L de méthanol par puits pendant 5 minutes. Ensuite le fixateur doit être complètement éliminé par aspiration et séchage. La coloration est réalisée en ajoutant 400 μ L de colorant *Giemsa-Stain* dilué au vingtième dans de l'eau distillée. L'observation des cellules au microscope permet de suivre la coloration, quand les noyaux des cellules sont bien colorés, les cellules sont rincées à l'eau distillée.

Les cultures cellulaires primaires ont été établies à partir de la moelle osseuse de tibias ou de fémurs issus de souris Balb/c à 4 semaines d'âge. La croissance et la différenciation des cellules osseuses ont été étudiées à plusieurs concentrations de collagène hydrolysé (de 0,2 à 1,0 mg/mL). Les hydrolysats sont de plusieurs origines (porcins, bovins, piscicoles) et ont plusieurs poids moléculaires (2 000 et 5 000 Da). La protéine témoin utilisée est la BSA.

La croissance des ostéoblastes et des ostéoclastes a été mesurée après 14 semaines de culture par fluorométrie à l'aide du kit FluoReporter® Blue Fluorometric dsDNA Quantitation Kit (Molecular Probes). Des observations microscopiques ont été réalisées grâce à des colorations Giemsa (Sigma).

La différenciation ostéoblastique a été évaluée par dosage de l'activité de la phosphatase alcaline.

Ostéoclastes: la résorption osseuse due à l'activité ostéoclastique a été mesurée par puits assays avec le kit BD BioCoat™ Osteologic™ bone cell culture system (BD Bioscience) après 14 jours de culture.

L'observation de la digestion du film de culture a été effectuée au microscope.

Nos résultats *in vivo* montrent que la prise de 25 g/kg de régime de collagène hydrolysé pendant 12 semaines entraînent l'augmentation du diamètre externe de la zone corticale du fémur, sans modification de la taille de la zone médullaire chez les souris C3H/HeN ayant subi une ovariectomie à 3 mois. Ceci permet aux fémurs d'être plus résistants à la cassure.

Nos résultats *in vitro* montrent une augmentation de l'activité ostéoblastique en présence de peptides issus de la dégradation du collagène hydrolysé, et une diminution des zones de résorption de l'os dans ces mêmes conditions. Cette augmentation du ratio formation/résorption du métabolisme osseux est sans doute à l'origine de l'augmentation de la taille des fémurs observés dans nos études *in vivo*.

PROTOCOLE DE L'OVARIECTOMIE

1. But

Le but de cette chirurgie est de stériliser une souris par ligature puis ablation des ovaires.

2. Matériel

- Lampe à lumière froide
- Lampe de bureau
- Désinfectant de surface pour le matériel
- Pour l'anesthésie : (Xylamine-Kétamine)
- Seringues 1 mL
- Aiguilles marrons 26G x ½ µ - 0,45 x 12 mm
- Vétédine savon
- Gants stériles
- Blouse stérile
- 1 pissette d'alcool 70°
- Instruments de chirurgie stériles :
 - lames de bistouris
 - 2 petites pinces fines à bouts pointus
 - 1 paire de petits ciseaux à bouts pointus
 - 2 petits clampes
 - 1 porte aiguille
- Champs opératoires et colle en spray pour fixer les champs opératoires
- Dissolvant pour la colle
- Fil de suture auto résorbable (8-0 0,4 Ph eur. Ref JV7548 pour coudre la peau, 6-0 0,7 Ph. -Eur. Ref JV1012 pour le muscle et la ligature de l'ovaire)
- Matelas chauffant
- Désinfectant à base d'iode (Vétédine)
- Aluspray
- Antibiotique large spectre (Potencil)
- Solution isotonique stérile

- Glucose injectable
- Compresses stériles
- 1 cage de réveil tapissée de papier cellulose au fond.

7. Préambule

Lorsqu'un local est utilisé pour des actes chirurgicaux, il est nécessaire que celui-ci soit désinfecté avant. De ce fait, les paillasse de travail, le sol ainsi que tout matériel de proximité tel que les lampes, seront désinfectés à l'aide de produits prévus à cet effet par une action de contact, c'est-à-dire que les produits utilisés se présentent sous forme de spray et qu'il n'est pas utile de les essuyer. Bien entendu, les surfaces devront être lavées avant la désinfection.

Afin de ne pas contaminer le matériel ainsi que les instruments stériles lors de la manipulation des animaux, une deuxième personne « assistant » est nécessaire pour les soins pré et post opératoires.

8. Préparation du matériel et de la pièce

a) Paillasse pour la chirurgie

Une fois la salle propre et désinfectée,

- Installer le tapis chauffant sur une paillasse et l'allumer sur la position « 2 ». (soit point partout, même avant, soit rien)
- Installer et allumer, en face du tapis, une lampe à lumière froide qui permettra de mieux éclairer l'animal durant la chirurgie.
- Passer une couche de désinfectant à base d'iode (vétédine) sur le tapis avec une compresse.
- Après avoir mis des gants stériles, installer les instruments de chirurgie (préalablement stérilisés dans un four _ Poupinel _ 2 heures à 180°C ou par chaleur humide à 120°C pendant 20 minutes) sur le tapis chauffant en face de soi.
- Demander à « l'assistant » d'ouvrir au-dessus du tapis chauffant une pochette de champs opératoires stériles ainsi que des compresses.
- Récupérer les champs et les couper à l'aide de ciseaux (stériles) de manière à ce qu'ils aient une surface de 15 cm² puis réaliser en leur centre un petit trou d'1 cm².
- Ranger les champs sur un côté du tapis.
- Ranger également les compresses stériles sur un côté du tapis chauffant.

b) Paillasse pour les soins pré et post opératoires

Ranger sur l'autre paillasse tout le matériel nécessaire aux soins pré et post opératoires tels que :

- les boîtes contenant les champs stériles, les compresses ...
- le flacon de vétédine solution
- l'Aluspray
- les différents flacons identifiés : anesthésie, antibiotique, morphinique, sérum physiologique, glucose ...
- les aiguilles et seringues nécessaires aux différentes injections
- une lampe de bureau positionnée au-dessus d'une cage dont le fond est tapissé de papier cellulosé (pour le réveil des animaux).

9. Soins pré opératoires

Après avoir pesé la souris, « l'assistant » anesthésie l'animal par voie intra péritonéale avec un mélange « kétamine/Xylazine » selon la procédure d'anesthésie disponible à l'animalerie.

Une fois la souris endormie, « l'assistant » la pose sur le flan et épile la partie basse des côtes jusqu'au bassin, pour obtenir une zone dépourvue de poils de la taille d'une pièce de 5 centimes. La zone est désinfectée par applications alternées d'alcool et de désinfectant vétédine (3 fois).

La souris est posée sur le flan, sur une partie éloignée du lieu où sera effectuée la chirurgie, sur le tapis chauffant.

La personne qui réalise la chirurgie se frotte vigoureusement les mains, les ongles et les avant-bras avec du savon vétédine à l'aide d'une petite brosse.

Ensuite, elle enfile sa blouse stérile avant de mettre ses gants stériles.

Elle récupère un champ stérile qu'elle présente à « l'assistant ».

« L'assistant » vaporise alors autour du trou central la colle en spray.

Le champ est posé de manière à appliquer le petit trou sur la zone dépoilée de la souris.

« L'assistant » retourne la souris (par la queue) sur son autre flan en prenant bien soin de ne pas toucher le champ stérile.

Le deuxième champ stérile est appliqué de la même manière que la première fois.

La souris est positionnée au centre du tapis face à l'expérimentateur pour la chirurgie.

10.Chirurgie – ovariectomie

- Pincer la peau au centre du flan de la souris au niveau du creux et faire une entaille d'environ 0,7 cm.
- Dilacérer le tissu adipeux sous cutané jusqu'au péritoine.
- Pincer le péritoine et réaliser une petite entaille d'environ 0,5 cm.
- Introduire une pince fine dans le trou du péritoine afin de pincer et de faire ressortir le tissu adipeux péri ovarien situé juste en dessous de l'orifice.
- Isoler l'ovaire à la base du pavillon et le clamper.
- Utiliser le fil « 6-0 0,7 Ph. -Eur. Ref JV1012 » pour réaliser une ligature sous le clamp de l'ovaire.
- Retirer l'ovaire à l'aide d'une lame de bistouri.
- Déclamper doucement et vérifier qu'il n'y ait pas de saignement*.
- * Si un saignement apparaît, il faut refaire la ligature.
- Retrouver le trou du péritoine et réintroduire la trompe et le tissu péri ovarien dans la cavité abdominale à l'aide des pinces.
- Recoudre le muscle à l'aide du fil « 6-0 0,7 Ph. -Eur. Ref JV1012 » en réalisant 2 points simples.
- Recoudre la peau à l'aide du fil « 8-0 0,4 Ph eur. Ref JV7548 » en réalisant un point en « U ».
- Retourner délicatement la souris sur son autre flan.
- Renouveler l'opération de la même façon pour retirer l'ovaire situé de l'autre côté.

11.Soins post opératoires

- Retirer les champs opératoires et essuyer les flans à l'aide de dissolvant afin de retirer la colle qui a servi à les garder en place durant l'acte chirurgical.
- Nettoyer les plaies à la vétédine.
- Vaporiser sur les plaies de l'Aluspray qui favorisera la cicatrisation en prenant soin de protéger les yeux de la souris.
- Injecter en sous cutané :
 - Une dose de potencil (antibiothérapie 0,01 mL/10 g) x (même chose : avant c'était *) 3 jours.
 - Une dose de morphine (2 à 5 mg/kg) ou de buprénorphine (0,05 à 0,1 mg/kg).
 - Une dose de glucose (0,2 mL)
- Mettre une goutte de sérum physiologique sur chaque œil à renouveler régulièrement jusqu'au réveil.
- Déposer la souris dans une cage propre dont le fond aura été, au préalable, tapissé de papier

cellulose absorbant.

- Disposer la cage sous une lampe de bureau, allumée, ce qui permettra de garder la souris au chaud jusqu'à son réveil.

Une fois la souris réveillée, l'installer dans une cage individuelle jusqu'à cicatrisation complète des plaies.

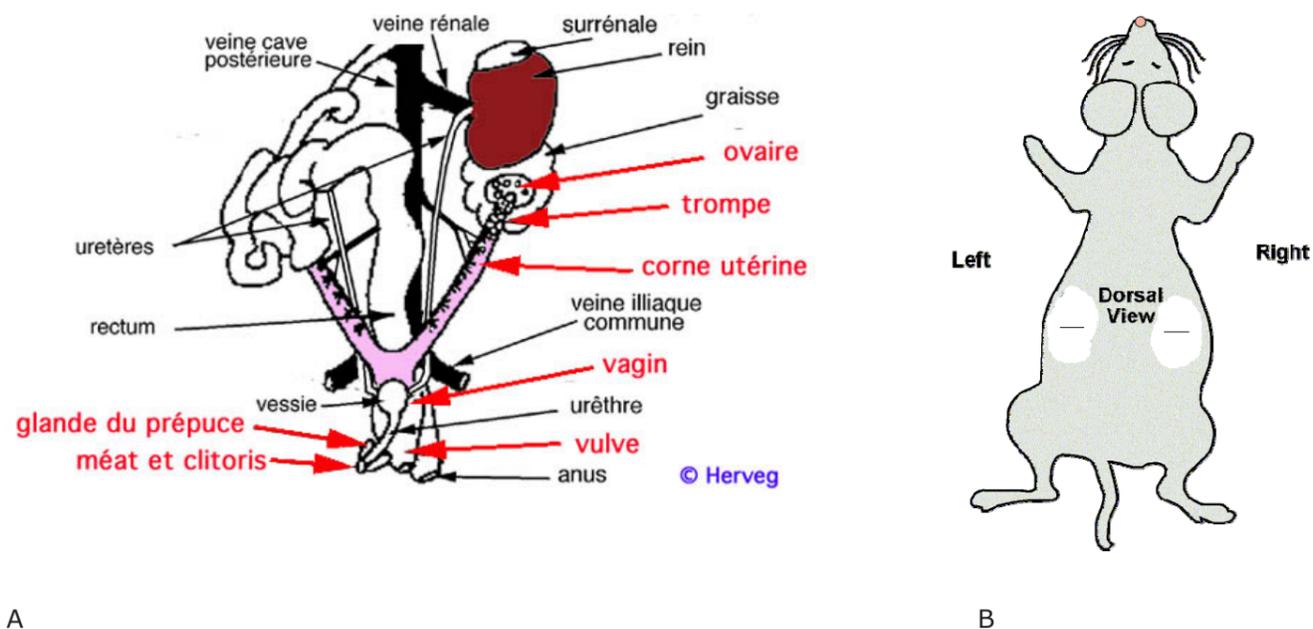


Figure 20 : A : Vue ventrale de la cavité abdominale d'une souris femelle B : Localisation des incisions au moment de la chirurgie

ETUDE in vitro PRELIMINAIRE

Nous avons, dans nos premiers résultats, analysé le comportement des deux cellules essentielles de l'os (ostéoblastes et ostéoclastes) lorsque celles-ci sont mises en culture en présence de peptides issus de l'hydrolyse du collagène. Nos résultats nous ont montré une action de ces peptides sur l'activité ostéoblastique essentiellement.

Les expériences présentées ci-après ont pour but d'analyser quelques marqueurs du métabolisme osseux afin d'avoir une première idée du mécanisme d'action et de proposer un protocole de travail pour de futures expériences.

Matériel et Méthode

Mise en culture des cellules: les cellules sont mises en culture tel que décrit précédemment dans des flasques de 25 mL. Nous avons travaillé sur des cultures cellulaires primaires établies à partir des tibias, fémurs ou humérus de souris C3H/HeN ou Balb/c. Les cellules sont mises en présence d'un milieu nutritif α -MEM avec 10% SVF et 10^{-8} de $1\alpha,25-(OH)2D3$. Nous ajoutons aux milieux de cultures des hydrolysats de collagène d'origine bovine (RCH), porcine (PCH), de volaille (Vo) ou de poisson (FCH) de poids moléculaire de 3 000 Da ou 6 000 Da, ou d'albumine de sérum bovin (BSA) utilisée en témoin.

Résultats:

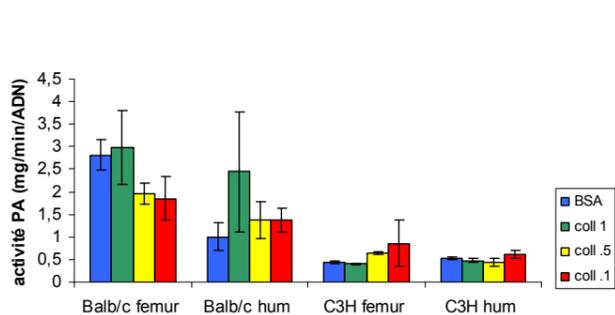


Figure 21 : Activité de la phosphatase alcaline selon la protéine intégrée à la culture à 7 jours

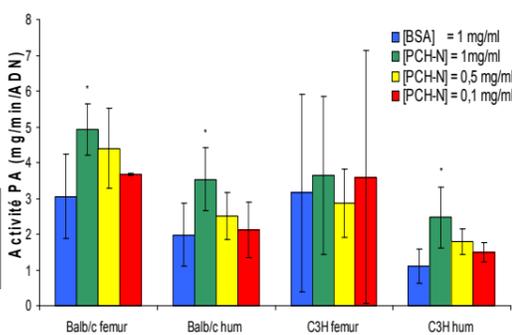


Figure 22 : Activité de la phosphatase alcaline selon la protéine intégrée à la culture à 14 jours

Nos résultats montrent une activité ostéoblastique plus importante à 14 jours par rapport à celle à 7 jours. Les ostéoblastes atteignent donc leur maturité entre 7 et 14 jours.

De plus, nous avons un même profil de réponse pour les deux races de souris et les deux types d'os à 14 jours, avec augmentation significative de l'activité ostéoblastique en présence d'hydrolysats de collagène et réponse de l'activité ostéoblastique dépendant de la concentration des hydrolysats de collagène introduits (excepté pour les cellules faites à partir des fémurs des C3H/HeN pour lesquelles un biais a dû être introduit dans nos expériences).

PROTOCOLE POUR L'ETUDE D'UN EVENTUEL EFFET TOXIQUE AU NIVEAU DU REIN

A fortes concentrations, risque-t-on une hypertrophie rénale et l'apparition de calculs rénaux comme effets secondaires de la prise de collagène hydrolysé ?

L'objectif de cette étude est de voir si, à fortes concentrations, nous obtenons des résultats similaires.

Matériel et Méthode :

Animaux et régimes : l'étude a porté sur 5 groupes de 10 souris C3H/HeN non opérées. Les souris sont mises par groupes à 12 semaines. Les souris ont été nourries pendant 12 semaines avec un régime AIN93 comprenant 200 g/kg de protéines de soja sans isoflavone comme protéine source et ont été supplémentées avec 0 (COLLO), 10 (COLL10), 25 (COLL25), 50 (COLL50) ou 100 (COLL100) kg/g de régime en collagène hydrolysé. 12 semaines après la chirurgie, les animaux ont été sacrifiés et disséqués. La composition corporelle a été étudiée. Une attention particulière a été portée au rein.

La DMO a été déterminée 2, 4, 8 et 12 semaines après chirurgie, par DXA à l'aide d'un Piximus (GE Medical Systems, software version 1.4 X lunar).

Résultat :

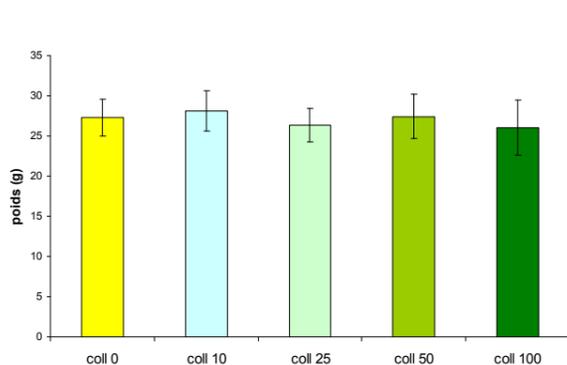


Figure23: Poids des animaux à 12 semaines

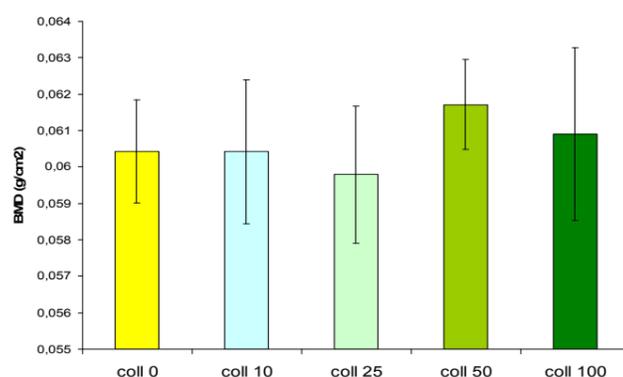


Figure24 : DMO des animaux à 12 semaines

Nos résultats montrent qu'il n'y a pas d'effet de la prise de collagène hydrolysé sur le poids des souris. De plus, nous n'obtenons pas de résultat significatif sur la DMO : l'effet de la prise du collagène hydrolysé sur le métabolisme osseux n'est donc pas visible sur souris « saine », non ovariectomisée. La prise de collagène hydrolysé peut donc compenser la perte osseuse induite par une chute hormonale au sein de l'organisme par exemple, mais ne rebalance pas le métabolisme osseux lorsque celui-ci est équilibré.

Lors de la dissection, nous avons fait la composition corporelle des souris. Pour le groupe COLL100, nous avons pu noter l'apparition d'hypertrophie rénale et l'apparition de calculs rénaux.

Nous avons donc confirmé l'effet néfaste de fortes doses de collagène hydrolysé sur le rein. Notons cependant que les doses nocives observées sont à 100 g/Kg de régime, c'est-à-dire 10 g/kg de poids corporel, ce qui correspondrait à la prise de 60g de collagène hydrolysé chez un sujet de 60 kg. Ceci représente des doses excessivement importantes de collagène hydrolysé dans l'alimentation, et donc hypothétiques mais non atteintes dans le cadre d'une alimentation équilibrée quotidienne.

BIBLIOGRAPHIE

AFSSA. Apports nutritionnels conseillés pour la population française 3e édition 2001. Editions Tech et Doc

Aarden EM et al., 1996, Immunocytochemical demonstration of extracellular matrix proteins in isolated osteocytes, *J Bone Miner Res* 106 (5): 495-501

Abelow BL et al., 1992, Cross-cultural association between dietary animal protein and hip fracture: a hypothesis., *Calcif Tissue Int.* , 50(1):14-8.

Adachi T et al., 2009, Osteocyte calcium signaling response to bone matrix deformation, *J biomech*, 42(15) :2507-2512

Ahlborg HG et al., 2003, Bone loss and bone size after menopause, *N Engl J Med*. 24;349(4):327-34.

Albagha OM et al., 2005, Association of oestrogen receptor alpha gene polymorphisms with postmenopausal bone loss, bone mass, and quantitative ultrasound properties of bone, *J Med Genet*, 42(3): 240-246

Ammann P, Rizzoli R, 2003, Bone strength and its determinant, *Osteoporos Int*, 14(3):13-18

Ammann P, Bourrin S, Bonjour JP, Meyer JM, Rizzoli R: Proteinundernutrition-induced bone loss is associated with decreased IGF-I levels and estrogen deficiency. *J Bone Miner Res* 15:683-690, 2000.

Arnett T, 2003, Regulation of bone cell function by acid-base balance, *Proc Nutr Soc.*;62(2):511-20.

Audran M et Legrand E, 1993, Ostéoporose: stratégie diagnostique et thérapie. In *Rhumatologie pratique*; hors série

Bass S et al., 1998, Exercices before puberty may confer residual benefits in bone density in adulthood :

studies in active prepubertal and retired female gymnastes, *J Bone Miner Res*, 13 :500-507

Bacon We et al., 1996, International comparison of hip fracture rates in 1988-1989, *Osteoporos Int*, 6:69-75

Baron R, 1996, Molecular mechanisms of bone resorption: therapeutic implications, *Rev Rhum Engl Ed*, 63 (10): 633-8

Barzel, U.S., 1995, The skeleton as an ion exchange system: implications for the role of acid-base imbalance in the genesis of osteoporosis. *J Bone Miner Res*,. 10(10): p. 1431-6.

Barzel, U.S. and L.K. Massey, Excess dietary protein can adversely affect bone. *J Nutr*, 1998. 128(6): p. 1051-3.

Bell J, Whiting SJ., 2002, Elderly women need dietary protein to maintain bone mass. *Nutr Rev.*;60(10 Pt 1):337-41.

Berard A, Bravo G, Gauthier P, 1997, Meta analysis of the effectiveness of physical activity for the prevention of bone loss in postmenopausal women, *Osteoporos Int*, 7 :331-337

Bodine P.V.N., Komm B, 2002, Vitamins and hormones. Tissue culture models for studies of hormon and vitamin action in bone cells, 64, p101-151.

Bonadio J et al., 1993, A murine skeletal adaptation that significantly increases cortical bone mechanical properties. Implications for human skeletal fragility, *J Clin Invest.* , 92(4):1697-705.

Bonjour JP et al., 1997, Calcium-enriched foods and bone mass growth in prepubertal girls, *J. Clin. Invest*, 99(6): 1287-1295

Bonjour, J.P., 2005, Dietary protein: an essential nutrient for bone health. *J Am Coll Nutr*,. 24(6): p. 526-36.

Bourrin S, Ammann P, Bonjour JP, Rizzoli R, 2000, Dietary protein restriction lowers plasma insulin-like

growth factor I (IGF-I), impairs cortical bone formation, and induces osteoblastic resistance to IGF-I in adult female rats. *Endocrinology* 141:3149–3155

Bourrin S, Toromanoff A, Ammann P, Bonjour JP, Rizzoli R, 2000, Dietary protein deficiency induces osteoporosis in aged male rats. *J Bone Miner Res* 15:1555–1563

Bouxeim M and Radloff S, 1997, Quantitative ultrasound of the calcaneus reflects the material properties of calcaneal trabecular bone. *J Bone Min Res*, 12:839-846

Bouxsein ML, Myers ER, Hayes WC, 1996, Biomechanics of age-related fractures. *Osteoporosis*, Academic Press, 373-393

Bouxsein, M.L., et al., Ovariectomy-induced bone loss varies among inbred strains of mice. *J Bone Miner Res*, 2005. 20(7): p. 1085-92.

Bradney M et al., 1998, Moderate exercises during growth in prepubertal boys: changes in bone mass, size, volumetric density, and bone strength: a controlled prospective study. *J Bone Miner Res*, 13:1814-1821

Burger H et al., 1998, Risk factors for increased bone loss in an elderly population: The Rotterdam study. *American journal of epidemiology*, 147:871-879

Burr, D.B., The contribution of the organic matrix to bone's material properties. *Bone*, 2002. 31(1): p. 8-11.

Cadogan J et al., 1997, Milk intake and bone mineral acquisition In adolescent girls: randomised, controlled intervention trial, *BMJ*, 315:1255-1260

Caetano_Lopez J, Canhao H, Fonseca JE, 2007, Osteoblasts and bone formation, *Acat Reumatol port* 32(2):103-110

Cano, A , et al., Comparative effects of 17 β -estradiol, raloxifene and genistein on bone 3D microarchitecture and volumetric bone mineral density in the ovariectomized mice. *Osteoporos Int*,

2008, 19: p. 793-800

Cardona JM, Pastor E, 1998, Calcitonin versus etidronate for the treatment of postmenopausal osteoporosis. A meta-analysis of published clinical trials., *Osteoporos Int*, 7:165-174

Cauley JA et al., 1995, Estrogen replacement therapy and fractures in older women, *Annals of medicine*, 117:1016-1037

Censi S et al., 2000, Estrogen deficiency induces bone loss by enhancing T-cell production of TNF-alpha. *J clin Invest*, 106(10):1229-1237

Chan YL, et al., 1985, The effect of metabolic acidosis on vitamin D metabolites and bone histology in uremic rats. *Calcif Tissue Int*. 1985 Mar;37(2):158-64.

Chan GM et al. 1995, Effects of dairy products on bone and body composition in pubertal girls. *J pediat* 126(4):551-556

Chapuy MC et al., 1994, Effects of calcium and cholecalciferol treatment for three years on hip fractures in elderly women, *BMJ*, 308: 1081-1082

Chiu JF, et al., 1997 Long-term vegetarian diet and bone mineral density in postmenopausal Taiwanese women. *Calcif Tissue Int*. ; 60(3):245-9.

Clemmons DR, Seek MM, Underwood LE. 1985 Supplemental essential amino acids augment the somatomedin-C/insulin-like growth factor I response to refeeding after fasting. *Metabolism*. 34(4):391-5.

Clemmons DR, et al., . 1985 Use of plasma somatomedin-C/insulin-like growth factor I measurements to monitor the response to nutritional repletion in malnourished patients. *Am J Clin Nutr*. 41(2):191-8.

Cooper GS, 1999, Genetic study of osteoporosis : what we have learned. *J Bone Miner Res*, 14 :1646-1648

Coxam V, 2003, Prevention of osteopaenia by phyto-oestrogens: animal studies, *British Journal of nutrition*, 89:75-85

Cumming RG, 1990, Calcium intake and bone mass: a quantitative review of the evidence. *Calcif Tissue int*, 47(4): 194-201

Currey J, 1969, The mechanical consequences of variation in the mineral content of bone. *Journal of biomechanics*. 2:1-11

Currey J, 1986, Effects of porosity and mineral content on the Young's modulus of bone. *European society of biomechanics*:5:104

Currey JD, 2001, Bone strength: what we are trying to measure ?, *Calcif Tissue Int*, 68:205-210

Darling AL et al., 2010, Dietary protein and bone health : a systematic review and meta-analysis, *Am J of Clin Nutr*, 90 :1674-92

Dawson – Hughes B, 1997, Effect of calcium and vitamin D supplementation on bone density in men and women 65 of age and older *N Engl J Med*, 337:670-676

Dawson – Hughes B, 2003, Interaction of dietary calcium and protein in bone health in humans., *J Nutr*. 2003 Mar;133(3):852S-854S.

Dawson-Hughes B. Calcium and protein in bone health.*Proc Nutr Soc*. 2003 May;62(2):505-9.

Dawson-Hughes B, Harris SS, Rasmussen H, Song L, Dallal GE. 2004 Effect of dietary protein supplements on calcium excretion in healthy older men and women.*J Clin Endocrinol Metab*. 89(3):1169-73.

Delmas PD, Hardy P, Garnero P, Dain MP. Monitoring individual response to hormone replacement therapy with bone markers. *Bone*

Dennison E et al., 1999, Determinants of bone loss in elderly men and women: a prospective study.

Osteoporos Int, 10:384-391

Ellerington MC et al., 1996, Intranasal salmon calcitonin for the prevention and treatment of postmenopausal osteoporosis, *Calcified Tissue International*, 59:6-11

Ellfors L et al., 1994, The variable incidence of hip fracture in Southern Europe: the MEDOS study. *Osteoporos Int*, 4:253-263

Ensrud KE et al., 1997, Weight change and fractures in older women. Study of osteoporotic fractures Research group. *Archives of internal medicine*, 157:857-863

Ettinger B, Genant HK, Cann CE, Long-term estrogen replacement therapy prevents bone loss and fracture. *Annals of internal medicine*, 317:1169-1174

Ettinger B et al., 1999, Reduction of vertebral fracture risk in postmenopausal women with osteoporosis treated with raloxifene: results from a 3-year randomized clinical trial. Multiple Outcomes of Raloxifene Evaluation (MORE) Investigators.", *JAMA*,8;282(22):2124.

Ferrari S, Rizzoli R, Bonjour JP, 1999, Genetic aspects of osteoporosis. *Current opinion in Rheumatology*, 11 :294-300

Flanagan AM and Sarma U, 1998, In vitro models for osteoclast recruitment. In "Methods in bone biology" (TR Arnett and B Henderson , eds), pp50-63, Chapman and Hall, London

Frenkel B et al., 2010, Regulation of adult bone turnover by sex steroids., *J Cell Physiol.*, [Epub ahead of print]

Feskanich D et al., 1996, Protein consumption and bone fractures in women.*Am J Epidemiol.* 1;143(5):472-9.

Freudenheim JL, et al., 1986, Relationships between usual nutrient intake and bone-mineral content of women 35-65 years of age: longitudinal and cross-sectional analysis., *Am J Clin Nutr.* 44(6):863-76.

Freudiger H and Bonjour JP, 1989, Bisphosphonates and extrarenal acid buffering capacity, *Calcif Tissue Int.* 44(1):3-10.

Fontana and Delmas, 2001, *Ostéoporose, clinique, épidémiologie et approche thérapeutiques, médecine/science*, 17 : 1297-305

Frassetto LA et al., 2000, Worldwide incidence of hip fracture in elderly women: relation to consumption of animal and vegetable foods. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 55(10):M585-92.

Fujikawa Y et al., 1996, The human osteoclast precursor circulates in the monocyte fraction. *Endocrinology*, 137:4058-4060

Gamero P, Sornay-Rendu E, Delmas PD, 2000, Low serum IGF-1 and occurrence of osteoporotic fractures in postmenopausal women. *Lancet* 355:898-899,.

Gao Y et al, 2004, Estrogen prevents bone loss through transforming growth factor beta signaling in T cells, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(47):16618-23

Gao Y et al., 2007, IFN-gamma stimulates osteoclast formation and bone loss in vivo via antigen-driven T cell activation, *J clin Invest* 117(1) : 122-132

Gardsell P et al., 1991, Bone mass in an urban and a rural population : a comparative, population-based study in southern Sweden, *J Bone Miner Research*, 6:67-75

Gehron R et al., 1992, The cellular biology and molecular biochemistry of bone formation. In "Disorders of Bone and Mineral Metabolism" (FL Coe and MJ Favus, eds), pp 241-264. Raven Press, New York

Goldstein S, Goulet R, McCubbrey D, 1993, Measurement and significance of three-dimensional architecture to the mechanical integrity of trabecular bone. *Calcified Tissue Int*, 53:127-133

Goulet R et al., 1994, The relationship between the structural and orthogonal compressive properties of trabecular bone. *Journal of biomechanics*, 27:375-389

Grady D et al., 1992, Hormone therapy to prevent disease and prolong life in postmenopausal women, 117:1016-1037

Hannan MT, 2000, Effect of dietary protein on bone loss in elderly men and women: the Framingham Osteoporosis Study., J Bone Miner Res., 15(12):2504-12.

Harris ST et al., 1993, Four-year study of intermittent cyclic etidronate treatment of postmenopausal osteoporosis- three years of blinded therapy followed by one year of open therapy. AM J of Med, 95:557-567

Harris ST et al., 1999, Effects of risedronate treatment on vertebral and non vertebral fractures in women with postmenopausal osteoporosis. A randomised controlled trial, JAMA, 282:1344-1352

Hartmann C 2006. A Wnt canon orchestrating osteoblastogenesis. Trends Cell Biol; 16: 151-158.

Heaney RP, 2002, Protein and calcium: antagonists or synergists? Am J Clin Nut, 75:609-10

Horowitz MC, 1993, Cytokines and oestrogen in bone : anti-osteoporotic effects. Science, 260 :626-627

Hughes FJ and Aubon JE, 1998, Culture of cells of the osteoblast lineage, In "Methods in Bone Biology" (TR Arnett and B Henderson , eds), pp 1-49, Chapman and Hall, London

Hunt IF et al., 1989, Bone mineral content in postmenopausal women: comparison of omnivores and vegetarians., Am J Clin Nutr.;50(3):517-23.

Hutchinson TA, Polansky SM, Feinstein AR, 1979, "post menopausal oestrogens protect against fractures of hip and distal radius", lancet, 2:705-709

Ioannidis JP et al., 2002, Association of polymorphisms of the estrogen receptor alpha gene with bone mineral density and fracture risk in women : a meta-analysis. J Bone Miner Res 17(11):2048-2060

Jiang JX, Siller-Jackson AJ, Burra S, 2007, Roles of gap junctions and hemichannels in bone cell functions and in signal transmission of mechanical stress, Front Biosci 12:1450-1462

- Jilka RL, 1998, Cytokines, bone remodeling , and estrogen deficiency : a 1998 update, Bone. 1998 Aug;23(2):75-81.
- Joakimsen R, Magnus J, Fonnebo V, 1997, Physical activity and predisposition for hip fractures : a review, Osteoporos Int, 7 :503-513
- Jonhnel O et al., 1992, The apparent incidence of hip fracture in Europe : a study of national register sources. MEDOS study group., Osteoporosis Int, 2:298-302
- Johnston CCJR, et al; 1992, Calcium supplementation and increases in bone mineral density in children, N Engl J Med, 327(2):82-87
- Jonhston CC, Slemenda CW, 1998, Pathogenesis of postmenopausal osteoporotic fractures, Osteoporosis, 53-64
- Jones HH et al., 1977, Humeral hypertrophy in response to exercise, J Bone Joint Surg Am. , 59(2):204-8.
- Katagiri T, Takahashi N., 2002, Regulatory mechanisms of osteoblast and osteoclast differentiation. Oral Dis. May;8(3):147-59.
- Kerstetter JE, et al., 2001, Dietary protein and intestinal calcium absorption. Am J Clin Nutr. 73(5):990-2.
- Kerstetter JE, et al., 2003, Dietary protein, calcium metabolism, and skeletal homeostasis revisited. Am J Clin Nutr. 78(3):584S-592S.
- Kiel DP et al., 1987, Hip fracture and the use of estrogens in postmenopausal women. The framingham study, N Engl J Med, 317:1169-1174
- Koji Iwai, et al., 2005, : Identification of food derived collagen peptides in human blood after oral ingestion of gelatin hydrolysates, J.Agric.food chem., 53, 6531-6536

- Koyama, Y., et al., 2001, Ingestion of gelatin has differential effect on bone mineral density and body weight in protein undernutrition. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*,. 47(1): p. 84-6.
- Krishnan V, Bryant HU, Macdougald OA, 2006, regulation of bone mass by Wnt signaling, *J clin Invest* 116(5) : 1202-1209
- Kudlacek S., B. Schneider, H.Resch, O.Freudenthaler, R. Willvonseder, 2000, "Gender differences in fracture risk and bone mineral density", *Maturitas*, Elsevier Science, 36(3): 173-180
- J.P.Marie, 2006, Strontium ranelate : A physiological approach for optimizing bone formation and resorption, *Bone*, 38, 10-14
- Lemann J Jr, 1999, Relationship between urinary calcium and net acid excretion as determined by dietary protein and potassium: a review., *Nephron.*;81 (1):18-25.
- Leszek, S , et al., 2009, A comparative study of the effects of genistein, estradiol and raloxifene on the murine skeletal system. *Acta Biochimica Polonica*, 2(56): p. 261-270
- Liberman UA et al., 1995, Effect of oral alendronate on bone mineral density and the incidence of fractures in postmenopausal osteoporosis, *N Eng J Med*, 337:382-387
- Lindsay R et al., 1980, Prevention of spinal osteoporosis in oophorectomised women, 2:705-709
- Lloyd T et al., 1996, The effect of calcium supplementation and Tanner stage on bone density, content and area in teenage women, *Osteoporos int*, 6(4):276-283
- Lochmuller EM et al., 2002, Mechanical strength of the proximal femur as predicted from geometric and densitometric bone properties at the lower limb versus the distal radius. *Bone*. 30(1):207-16.
- Lufkin EG et al., 1992, Treatment of postmenopausal osteoporosis with transdermal estrogen. *Annals of internal medicine*, 117:1-9

Lutz J: Calcium balance and acid-base status of women as affected by increased protein intake and by sodium bicarbonate ingestion. *Am J Clin Nutr* 39:281–288, 1984.

Maggi S et al., 1991, Incidence of hip fractures in the elderly : a cross national analysis, *Osteoporos Int*, 1 :232-241

Massey LK, Kynast-Gales SA: Diets with either beef or plant proteins reduce risk of calcium oxalate precipitation in patients with a history of calcium kidney stones. *J Am Diet Assoc* 101:326–331, 2001.

McCarthy TL et al., 2003, Runx2 integrates estrogen activity in osteoblasts, *J Biol Chem*. 2003 Oct 31;278(44):43121-9. Epub 2003 Sep 1

Mann, V., et al., 2001, A COL1A1 Sp1 binding site polymorphism predisposes to osteoporotic fracture by affecting bone density and quality. *J Clin Invest*,. 107(7): p. 899-907.

Marcus R, 1996, Mechanisms of exercise effects on bone, *Principles of bone biology*, Academic Press, 1135-1146

Mardon J et al., 2008, Influence of high and low protein intakes on age-related bone loss in rats submitted to adequate or restricted energy conditions. *Calcif Tissue Int*. 82(5):373-82.

Mardon J et al., 2009, Dietary protein supplementation increases peak bone mass acquisition in energy-restricted growing rats., *Pediatr Res*. 66(5):513-8.

Marie PJ, 2006, Strontium ranelate : a dual mode of action rebalancing bone turnover in favour of bone formation. *Curr opin Rheumatol*, 18(1°):11-5

Mazess RB and Barden HS. 1991 Bone density in premenopausal women: effects of age, dietary intake, physical activity, smoking, and birth-control pills. *Am J Clin Nutr*. 53(1):132-42.

Mizuno Morimichi and Yoshinori Kuboki, 2000-2001, Osteoblast-related gene expression of bone marrow cells during the osteoblastic differentiation induced by type I collagen. *J.biochem*. 129, 133-138

Metz JA et al., 1993, Intakes of calcium, phosphorus, and protein, and physical-activity level are related to radial bone mass in young adult women., Am J Clin Nutr. 58(4):537-42.

Meunier PJ et Boivin G, 1997, Bone mineral density reflects low bone mass but also the degree of mineralisation of bone. Therapeutic applications. Bone, 5:373-377

Meyer HE et al., 1997, Dietary factors and the incidence of hip fracture in middle-aged Norwegians. A prospective study. Am J Epidemiol. 1997 Jan 15;145(2):117-23.

Musey VC, Goldstein S, Farmer PK, Moore PB, Phillips LS. 1993 Differential regulation of IGF-1 and IGF-binding protein-1 by dietary composition in humans. Am J Med Sci. 305(3):131-8.

Nachtigall LE et al., 1979, Estrogen replacement therapy I: a 10-year prospective study in the relationship to osteoporosis, Obstetrics and gynecology, 1979, 53:277-281

Nakamura et al., 1999, Role of alpha(v)beta(3) integrin in osteoclast migration and formation of the sealing zone, Journal of Cell Science, Vol 112,

Naves-Diaz M, O'Neill TW, Silman A, 1997, "The influence of alcohol consumption on the risk of vertebral deformity. The European Vertebral Osteoporosis Study group", Osteoporosis Int, 7:65-71

Neale SD et al., 2000, Osteoclast differentiation from circulating mononuclear precursors in Paget's disease is hypersensitive to 1,25-dihydroxyvitamin D3 and RANKL. Bone, 27:409-416

Nijweide PJ et al., 1996, The osteocyte, Principles of bone biology, Academic press

Nuttall ME and Gimble JM, 2000, Is there a therapeutic opportunity to either prevent or treat osteopenic disorders by inhibiting marrow adipogenesis? Bone:27:177-184

Oesser S, Adam M, Babel W, Seifert J. 1999 Oral administration of (14)C labeled gelatin hydrolysate leads to an accumulation of radioactivity in cartilage of mice (C57/BL). J Nutr. Oct;129(10):1891-5.

Oreffo RO et al, 1989, Activation of the bone-derived latent TGF beta complex by isolated osteoclasts.

Biochem Biophys Res commun, 158(3):817-23

Owen TA et al., 1991, Pleiotropic effects of vitamin D on osteoblast gene expression are related to the proliferative and differentiated state of bone cell phenotype: dependency upon basal levels of gene expression, duration of exposure, and bone matrix competency in normal rat osteoblast cultures. *Endocrinology*, 128(3):1496-504

Paganini-Hill A et al., 1981, Menopausal estrogen therapy and hip fractures. *Annals of internal medicine*, 95:28-31

Pfeilschifter J et al., 2002, Changes in pro-inflammatory cytokine activity after menopause. *Endocr Rev* 23(1):90-119

Promislow JH et al., 2002, Protein consumption and bone mineral density in the elderly : the Rancho Bernardo Study., *Am J Epidemiol.* 2002 Apr 1;155(7):636-44.

Quarles LD, et al., 1992, Distinct proliferative and differentiated stages of murine MC3T3-E1 cells in culture : an in vitro model of osteoblast development. *J Bone Miner Res*, 7(6):683-92

Rapuri PB et al., 2003, Protein intake: effects on bone mineral density and the rate of bone loss in elderly women., *Am J Clin Nutr.* 77(6):1517-25.

Reid IR, 1993, Effect of calcium supplementation on bone loss in postmenopausal women, *N Engl J Med*, 18:460-464

Riggs CM, Whitehouse GH, Boyde A, 1999, Pathology of the distal condyles of the third metacarpal and third metatarsal bones of the horse. *Equine Vet J* 31:140-148

Rizzoli R, Bonjour JP, 1999, Determinants of peak bone mass and mechanism of bone loss, *Osteoporosis Int*, 9 :17-23

Rochira et al., 2005, Bone loss, sex steroids and male age related hypogonadism, *J Endocrinol Invest*, 28:46-8

Roughead ZK, 2003, Is the interaction between dietary protein and calcium destructive or constructive for bone?, *J Nutr.* 133(3):866S-869S.

Rubin J, Rubon H et Rubon C, 1999, Constraints of experimental paradigms used to model the aging skeleton. In *the Aging skeleton*, 27-36. San Diego, CA: academic Press

Sambrook PN et al., 1996, Genetic determinants of bone mass, *Osteoporosis*, Academic Press, 477-482

Schurch MA et al., 1998, Proteins supplement increase serum insulin like growth factor I levels and attenuate proximal femur bone loss in patients with recent hip fracture. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial, *Ann Intern Med*, 128(10):801-9

Seeman E, 1996, The effect of tobacco and alcohol use on bone. *Osteoporosis*, Academic Press, 577-597

Seeman E, Delmas PD. 2006 Bone quality—the material and structural basis of bone strength and fragility. *N Engl J Med*; 354: 2250-2261.

Seeman E et al., 2001, Fracture site – specific deficits in bone size and volumetric density in men with spine or hip fractures, *J Bone Miner Res.*;16(1):120-7.

Sellmeyer DE et al., 2001, A high ratio of dietary animal to vegetable protein increases the rate of bone loss and the risk of fracture in postmenopausal women. Study of Osteoporotic Fractures Research Group., *Am J Clin Nutr.* 2001 Jan;73(1):118-22.

Skaggs DL et al., 2001, Increased body weight and decreased radial cross-sectional dimensions in girls with forearm fractures, *J Bone Miner Res.*;16(7):1337-42.

Smith EP et al., 2010, Recent experimental and clinical findings in the skeleton associated with loss of estrogen hormone or estrogen receptor activity, *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2010 Feb 28;118(4-5):264-72. Epub 2009 Nov 10.

Snyder BD and Hayes WC, 1990, Multiaxial structure-propertyrelations in trabecular bone. In *mow VC*,

ratcliffe A and Woo SL-Y (eds). Biomechanics of Diarthrodial Joints. New York: Springer , 31-59

Sugimoto T, Nishiyama K, Kuribayashi F, Chihara K: Serumlevels of insulin-like growth factor (IGF) I, IGF-binding protein(IGFBP)-2, and IGFBP-3 in osteoporotic patients with and without spinal fractures. J Bone Miner Res 12:1272-1279, 1997.

Takeuchi Y, Suzawa M, Kikuchi T, Nishida E, Fujita T, Matsumoto T, 1997, Differentiation and transforming growth factor B receptor down-regulation by collagen A2B1 integrin interaction is mediated by focal adhesion kinase and its downstream signals in murine osteoblastic cells, The journal of biological chemistry, Vol 272, n°46, 29309-29316

Teitelbaum SL, 1996, The osteoclast and osteoporosis, Mt Sinai J Med, 63(5-6):399-402.

Teitelbaum SL, 2000, Osteoclasts, intégrines, and osteoporosis, J Bone Miner Metab. 2000;18(6):344-9.

Thissen JP, Pucilowska JB, Underwood LE. 1994 Differential regulation of insulin-like growth factor I (IGF-I) and IGF binding protein-1 messenger ribonucleic acids by amino acid availability and growth hormone in rat hepatocyte primary culture. Endocrinology. Mar;134(3):1570-6.

Thissen JP, Ketelslegers JM, Underwood LE. 1994 Nutritional regulation of the insulin-like growth factors. Endocr Rev. Feb;15(1):80-101.

Thissen JP, Underwood LE. 1992 Translational status of the insulin-like growth factor-I mRNAs in liver of protein-restricted rats. J Endocrinol. Jan;132(1):141-7.

Thissen JP, Underwood LE. 1992 Translational status of the insulin-like growth factor-I mRNAs in liver of protein-restricted rats. J Endocrinol. Jan;132(1):141-7.

Turner CH, 2006, Bone strength : current concepts, Ann. NY Acad Sci 1068 :429-446

Ulrich D et al., 1999, The ability of three-dimensional structural indices to reflect mechanical aspects of trabecular bone. Bone, 25(1):55-60

- Vanderschueren et al., 2008, Androgens and bone, *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* ,15(3):250-4.
- Wang MC, et al., 1997 Bone mass and hip axis length in healthy Asian, black, Hispanic, and white American youths. *J Bone Miner Res.* 12(11):1922-35.
- Wang MC, Luz Villa M, Marcus R, Kelsey JL. 1997; Associations of vitamin C, calcium and protein with bone mass in postmenopausal Mexican American women. *Osteoporos Int.* 7(6):533-8.
- Watanabe-Kamiyama M et al., 2010, Absorption and effectiveness of orally administered low molecular weight collagen hydrolysate in Rats, *J Agric Food Chem*, 58 :835-841
- Weiss NS et al., 1980, "Decreased risk of fractures of the hip and lower forearm with postmenopausal use of estrogen", *N Engl J Med*, 303:1195-1198
- Weitzmann MN and Pacifici R, 2005, The role of T lymphocytes in bone metabolism, *Immunol Rev* 208 :154-168
- Wu J, Fujioka M, Sugimoto K, Mu G, Ishimi Y. 2004. Assessment of effectiveness of oral administration of collagen peptide on bone metabolism in growing and mature rats. *J Bone Miner Metab.*;22(6):547-53.
- Xiao G et al. 1998. Role of the alpha2-integrin in osteoblast-specific gene expression and activation of the Osf2 transcription factor. *J Biol Chem*; 273 (49):32988-94
- Yamaguchi S et al., 2005, Study of a rat model for calcium oxalate crystal formation without severe renal damage in selected conditions. *Int J Urology*, 12:290-298
- Zhao H, et al, 2010, "How do bone cells secrete proteins?", *Adv Exp Med Biol*, 658: 105-9