



UE : UE 18 Appareil Locomoteur

ENSEIGNANT : Carré

DATE : 01/10/24

GROUPE : PERSON Marine, BELLENOUE Elora

REMARQUES : les étoiles (★) signifient que les informations sont pour votre propre culture. Pas de questions sur la biologie cellulaire car il n'y connaît rien. Pas de question sur les structures biochimiques. Ranélate de strontium a été arrêté donc il n'en parle plus.

Marqueurs biochimiques du remodelage osseux

Table des matières

I)	Rappels sur la physiologie des os	2
	A) 2 types d'os	2
	B) Le collagène	2
	C) Pyridinoline (+++) : 30%	5
	D) Les autres protéines matricielles	7
	E) Minéralisation	7
	F) Renouvellement osseux (+++)	7
	G) Ostéoclaste	9
	H) Ostéoblastes	9
	1) RANK et RANK-L (L : ligand)	10
	2) OPG = Ostéoprotégérine	11
	I) Masse osseuse	12
		12
	J) Définitions	12
II)	Les marqueurs biochimiques de la résorption osseuse	13
	A) Témoins de la dégradation du collagène	13
	1) Calcium urinaire	13
	2) Hydroxyproline urinaire libre et totale	14
	3) Molécules de pontage du collagène (Ddp et Pyd)	14
	4) Fragments télopeptidiques N et C terminaux du collagène de type I :	14
	B) Activité ostéoclastique	15
	1) RANK-L et OPG Dosage Elisa dans le sérum par des Ac +++	15
	2) Phosphatase Acide Tartrate Résistante (TRACP)	15
	3) Cathepsine K	16

III) Les marqueurs biochimiques de la formation osseuse	16
A) <i>Phosphatase alcaline</i>	16
B) <i>Ostéocalcine sérique</i>	16
C) <i>Peptides d'extension du collagène de type I</i>	16
IV) Variabilité des marqueurs biochimiques du remodelage osseux	17
A) <i>Variabilités contrôlables</i>	17
B) <i>Variabilités non contrôlables</i>	17
V) Utilité clinique des marqueurs biochimiques du remodelage osseux	18
VI) Utilité intellectuelle des marqueurs du remodelage osseux	18

Les objectifs du cours :

- Comprendre la physiologie osseuse
- En déduire le choix des paramètres à doser en fonction de la pathologie suspectée

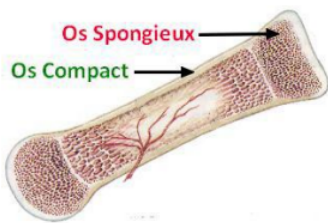
I) Rappels sur la physiologie des os

Le squelette comporte environ 200 os (peut varier selon la personne). *Valeur approximative car il peut y avoir des os surnuméraires ou à l'inverse des fusion d'os.*

Il a plusieurs rôles (3) :

- 1) **Mécanique/structure** :
 - Passif : charpente et protection des organes internes (ex : boîte crânienne, grill costal)
 - Actif : mouvements
- 2) **Métabolique** : réservoir Phosphore/Calcium avec des échanges permanents avec la structure osseuse. *(Toujours analyser le taux de calcium avec l'albumine et le taux de protéines)*
- 3) **« Cellulaire »** : Formation de cellules sanguines

A) 2 types d'os



- Cortical (externe) : **80%** de la masse du squelette. C'est une couche fine/dense/calciifiée (contient toute la réserve phosphocalcique).
- Trabéculaire (interne) : **20%** de la masse totale mais 80% du renouvellement (tissu sanguin et matrice osseuse). Composé de 15 à 25% de matrice osseuse et de tissu hématopoïétique.

Qu'est-ce que l'os sur le plan moléculaire ?

- Une **fraction minérale** (se colle sur la partie organique) : 70% de calcium et de phosphore
- Une **fraction organique** : 30%
 - o. Cellules (renouvellement de la masse osseuse et cellules hématopoïétiques)
 - o. Une trame (matrice) extracellulaire : collagène + protéines non collagéniques (utilisée aussi comme marqueurs du métabolisme osseux).

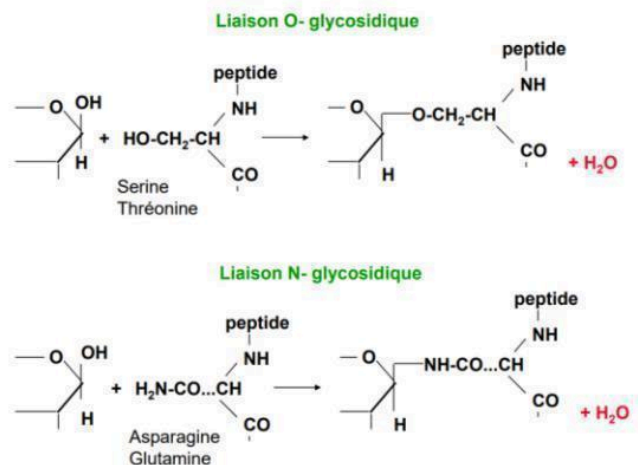
B) Le collagène

Le collagène est une glycoprotéine.

C'est-à-dire des chaînes polypeptidiques sur lesquelles sont branchés des sucres < 50% (Inverse de protéoglycanes > 50% de sucres). *Plus de protéines que de glucides dans les glycoprotéines (en opposition aux protéoglycanes). Il y a une déshydratation intermoléculaire entre un résidu alcoolique et un aldéhyde*

→ Formation d'un cycle hémiacétalique

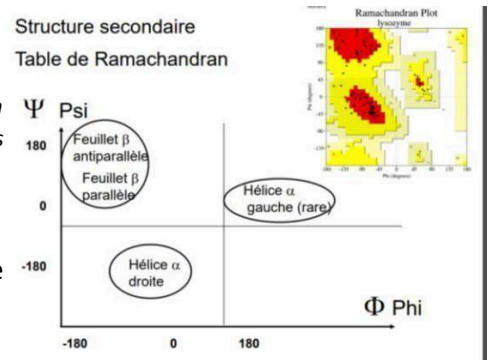
- Condensation avec des acides aminés constitutifs des protéines



Caractéristique du collagène : la répétition de motif Gly-X-Y

- X : Proline pour 1/3 des cas. La particularité de la proline c'est la cyclisation avec la fonction amine, le fait de bloquer cette structure là va bloquer dans l'espace en forme d'hélice.
- Y : Hydroxyproline pour 1/3 des cas

Du fait de ces séquences, on observe un repliement en hélice de ces chaînes (structure secondaire)



La structure secondaire dépend de la valeur de ces 2 angles, dits angles dièdres : Φ= phi et Ψ= psi

En théorie, toutes les combinaisons sont possibles.

En pratique, ce sont les encombrants des substituants des atomes de la « colonne vertébrale » de la chaîne peptidique qui permettent ou non ces différentes organisations.

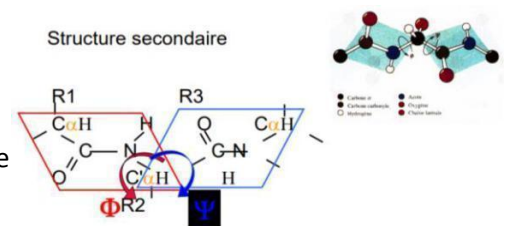
Il n'est pas nécessaire de connaître la table de Ramachandran.

2 angles de rotation :

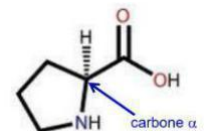
- Φ (phi) : se situe entre le NH et le C alpha
- Ψ (psi) : entre le C alpha et le CO



Ces deux angles de rotation déterminent la configuration du peptide dans l'espace.



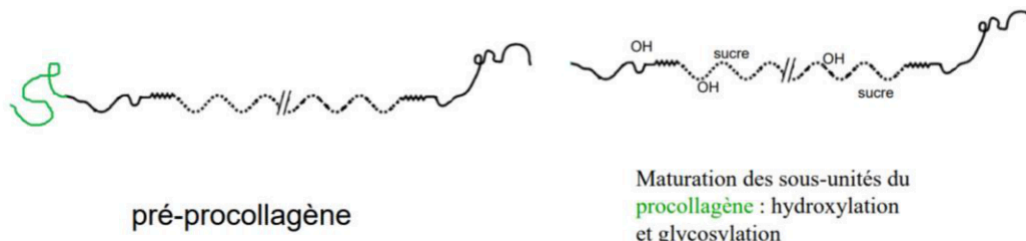
Cas particulier de la proline : angle Φ est bloqué (car c'est une molécule cyclique), donc cette rigidité entraîne la formation de coude dans les peptides.



Formation du collagène :

Les chaînes s'associent par 3 et forment une super hélice. Le plus abondant, le type I, est composé de 2 chaînes α1 et d'une chaîne α2 (codées par des gènes différents, donc structure primaire et longueur différentes). (pour la culture personnelle)

- **Synthèse dans le REg** (réticulum endoplasmique granuleux) de pré-procollagène = 1 hélice entourée de 2 domaines globulaires, les propeptides N et C terminaux ; plus un peptide signal.
- **Maturation dans le REg** du procollagène : libération du peptide signal, puis hydroxylation des Proline et Lysine et glycosylation des hydroxylysines.
- **Association de 3 sous-unités de procollagène** en 1 triple hélice de procollagène dans le Golgi.
- **Excrétion dans le milieu extra-cellulaire (MEC).**

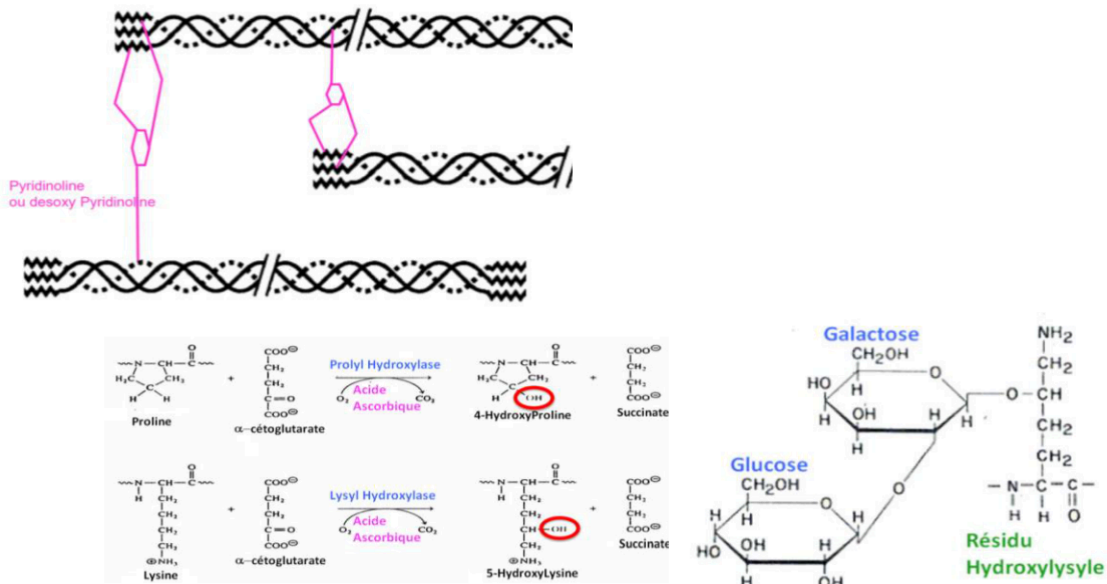


Ne pas connaître la localisation des différentes actions.

On parle de pré-procollagène car il y a un peptide signal qui permet d'orienter la molécule vers l'endroit où elle va maturer, qui sera ensuite éliminé lorsque la molécule aura atteint son lieu de maturation.

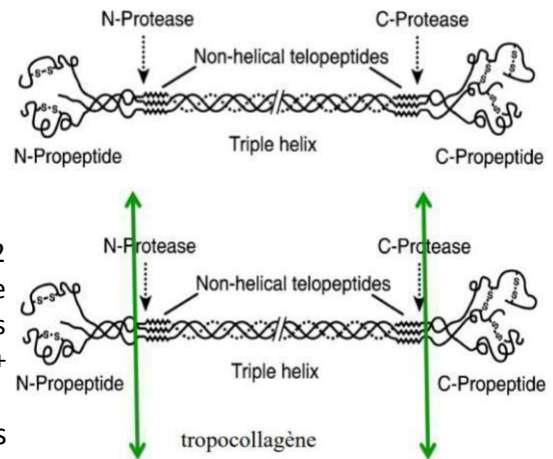
Il est formé d'une partie propeptide N-terminal de forme non hélicoïdale, une partie C-term hélicoïdale (liée à la présence de proline) et entre les deux une hélice.

La maturation des sous unités du procollagène va se faire par hydroxylation et glycosylation.



Il n'est pas attendu que les formules des molécules soient connues.

Pro-collagène :



Dans le MEC : action de protéases clivant 2 propeptides (PINP et PICP) et on obtient 1 tropocollagène formé d'une hélice (triple hélice) centrale et 2 parties télépeptidiques (partie non hélicoïdale) de 10 à 25 AA. (Télo + tropo= proto).

Ces hélices s'associent en fibrilles par pontages intra- et extra-moléculaires réalisant des liaisons croisées (cross-links : a un intérêt dans la pratique médicale = "Xlinks") qui confèrent rigidité, solidité (os) et propriétés mécaniques, un peu moins rigide (cartilage). On obtient alors des fibrilles de collagène.

PICP : propeptide C-terminal du collagène I

PINP : propeptide N-terminal du collagène I

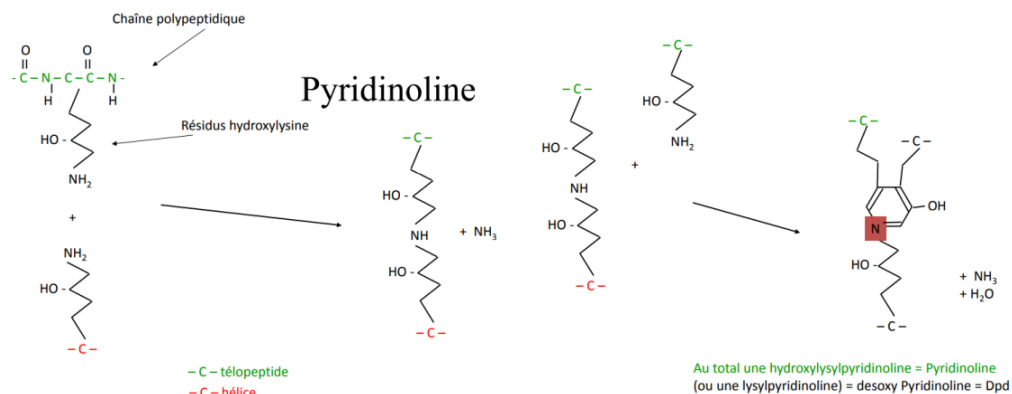
L'association de fibrilles de collagène donne des fibres de collagène, qui s'assemblent à l'extérieur de la cellule (car les protéases sont extracellulaires).

Association entre les molécules de tropocollagène pour donner des fibrilles de collagène.

Savoir qu'il y a des hydroxylations et glycosylations durant la maturation du collagène.

C) Pyridinoline (+++) : 30%

C'est un marqueur de remodelage osseux, on utilise plutôt la **désoxypyridinoline** (70%) en réalité.

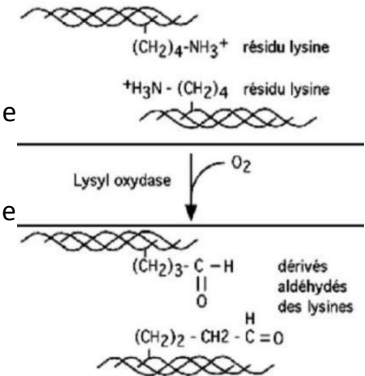


La pyridinoline est une molécule formée de trois (hydroxy) lysines qui se sont assemblées. C'est un marqueur qui peut être utilisé aujourd'hui, important pour suivre un patient qui a une pathologie osseuse. Le télopeptide est la partie initiale de la triple hélice de collagène, après avoir coupé les propeptides. Le résidu hydroxylysine de la première chaîne polypeptidique (télopeptide donc premier collagène) s'associe à la partie hélicoïdale d'une autre chaîne polypeptidique d'un autre collagène. Cela donne une chaîne inter polypeptidique. Cette liaison n'est pas très stable il y a alors une cyclisation (avec un azote au milieu = hétérocycle). (pas de question à l'examen).

- Les autres ponts inter tropocollagène :

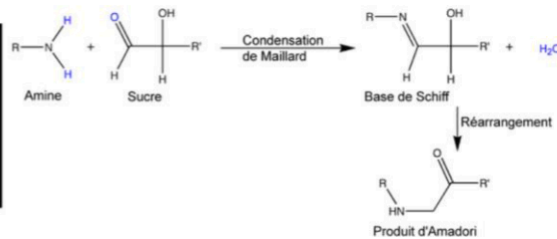
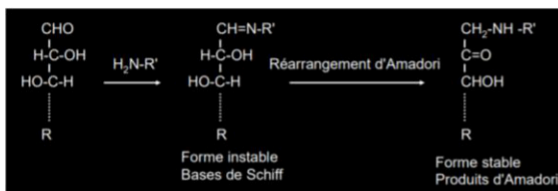
Bases de Schiff (par la réaction de Maillard) par les aldéhydes de lysine, l'allyle lysine

- Réaction de Maillard : crée les produits qui donne du goût à la viande lorsqu'elle est cuite à la poêle
- Aldolisation de deux allyle-lysine (réaction entre 2 aldéhydes)



Formation de bases de Schiff par la réaction de Maillard : “vous devez vous en souvenir”

Réaction de Maillard : ose + groupement amine des protéines (à chaud, en milieu anhydre, phénomène non enzymatique)



- 1) L'oxydase enlève la partie aminée qui est remplacée par une fonction aldéhyde (= aldolisation)
 - Forme instable (base de Schiff)
 - Réarrangement d'Amadori
 - Forme stable : produits d'Amadori

Ex : Glucose + Hb (Val N terminale) ou Protéine :

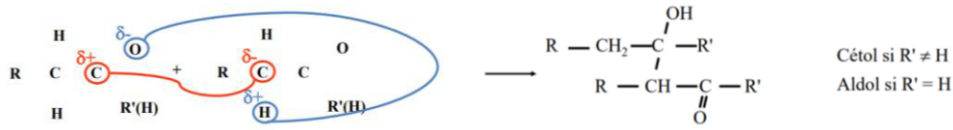
- Hémoglobine glyquée
- Ou Protéine glyquée (fructosamines)
- Marqueurs du diabète

L'aldolisation concerne soit : - 2 molécules d'aldéhydes
 - 2 molécules de cétones
 - 1 aldéhyde et 1 cétone
 ... pour donner un aldol (aldéhyde alcool) ou un cétoal (cétone alcool)

Chacune des 2 molécules adopte un mécanisme de réaction différent. Il va y avoir intervention de charges :

- Une charge négative est portée par l'oxygène et une charge positive portée par le carbone d'une molécule cela crée une polarisation
- L'autre polarisation est due à une charge négative sur le carbone et une charge positive sur l'hydrogène (sur la deuxième molécule).

On va donc avoir attractivité des deux molécules due à leurs charges négatives et positives et cela va permettre l'aldolisation (réaction de condensation entre 2 aldéhydes ou 1 aldéhyde et 1 cétone).



En médecine, les aldolases catalysent ces réactions (dans le foie) et sont utilisées comme marqueurs hépatiques (dans le cas d'hépatites aiguë et de cancers hépatiques)

Toutes ces formations de ponts vont influencer la structure/rigidité/déformation du collagène.

Pathologie → l'ostéomalacie : les os se déforment car ils manquent de minéralisation, cette possibilité de déformation est due au fait que le collagène n'est pas complètement rigide (la MEC peut se déformer car il manque des minéraux).

Les ponts s'effectuent entre la partie non hélicoïdale et les hélices d'autres molécules de tropocollagène.

D) Les autres protéines matricielles

Gla-protéines : porteuse d'acide γ carboxyglutamique (par **modification post-traductionnelle** d'acide glutamique : ajout d'un deuxième carboxyle en post-trad). La plus abondante = l'ostéocalcine.

Protéines à séquences RGD (Arg-Gly-Asp). Ces séquences entraînent des propriétés spécifiques d'adhésivité et reconnaissance, elles ont un rôle dans les interactions matrice/cellules par des **récepteurs de surface cellulaires** (intégrines) qui reconnaissent ces RGD :

- Ex : ostéopontine (bone sialoprotéine I) et sialoprotéine osseuse (bone sialoprotéine → riche en acides sialiques (= D mannosamine condensé avec un acide Pyruvique, subissant une N-acétylation)
- Thrombospondine, fibronectine
- Protéoglycanes
- Osteonectine
- Facteurs de croissances (IgF1 et II, FGF, TGF, ...)

⇨ Os, cartilage, MEC, ...

E) Minéralisation

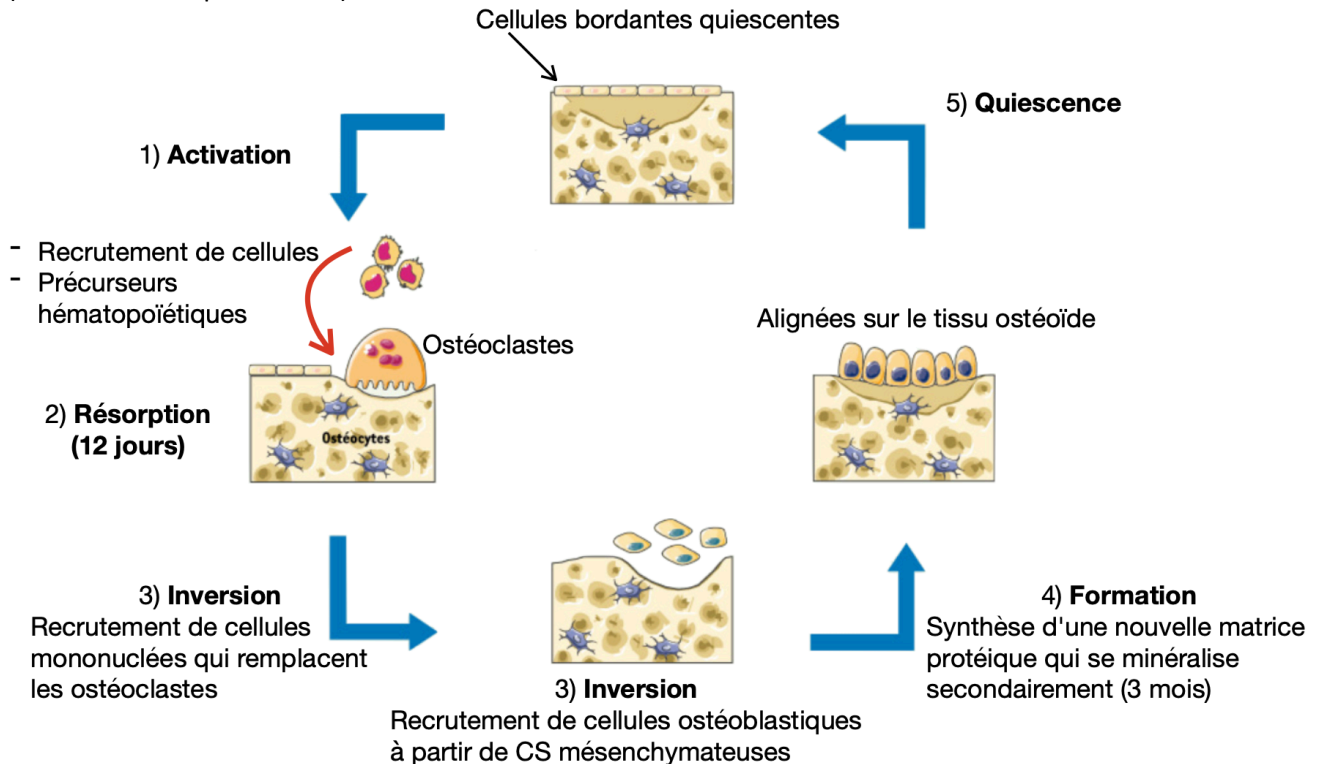
La minéralisation de la matrice (tissu ostéoïde) se fait par ajout de sel de phosphate de calcium apparenté à l'hydroxyapatite ($Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$) qui se dépose entre les fibres de collagène.

NB : L'hydroxyapatite est retrouvée dans les calcifications et calculs rénaux notamment.

F) Renouvellement osseux (+++)

Le renouvellement osseux est un **cycle permanent** (à un stade différent selon l'endroit) qui assure le remplacement de **10%** du squelette par an (déterminé historiquement avec un marqueur comme le calcium radioactif). Il existe une régulation assurant un équilibre entre résorption et formation. Un déséquilibre aboutit très vite à une perte osseuse puisque l'activité clastique est beaucoup plus rapide que la blastique, c'est pourquoi les facteurs de régulation doivent être finement régulés.

La matrice osseuse est faite de travées de fibrilles sur lesquelles se déposent calcium et phosphore, on y trouve quelques ostéocytes. A la surface de ce tissu, il y a des cellules bordantes, qui sont quiescentes (aucune activité particulière) et mononucléées. Elles recouvrent la matrice.



Phases du cycle de renouvellement osseux :

1. Activation et recrutement des cellules souches hématopoïétiques (CSH).
2. Résorption : les CSH vont se transformer en ostéoclastes. A la place des cellules bordantes, ces ostéoclastes vont commencer à grignoter la matrice organique et minérale => cela crée un trou. Durée de la résorption : 12 jours.
3. Inversion : des changements de régulation vont se mettre en route pour que la phase précédente s'arrête. Au bout de 12 jours, c'est donc l'inversion et des cellules mononucléées vont venir remplacer les ostéoclastes (mécanismes compensateurs, notion de boucle de régulation) => il y a recrutement d'autres précurseurs ostéoblastiques à partir des CSH, qui synthétisent une nouvelle matrice.
4. Ces précurseurs vont progressivement mûrir et on aura une phase de formation où il y aura fabrication d'une nouvelle matrice osseuse protéique qui va secondairement se minéraliser. Durée de la phase de formation : 3 mois.
5. Phase de quiescence : les ostéoblastes entrent en quiescence et ont alors 3 devenir possibles :
 - Soit deviennent des cellules bordantes
 - Soit meurent par apoptose
 - Soit donnent des ostéocytes

G) Ostéoclaste

Les ostéoclastes sont des cellules plurinucléées, issues d'un précurseur hématopoïétique qui acquiert, par sa différenciation, l'expression :

→ Du récepteur à la calcitonine

→ De l'activité phosphatase acide tartrate résistante : marqueur qui est le reflet de l'activité clastique des cellules

→ De l'intégrine alpha-v-bêta-3

Intéressant pour marquer les cellules par des techniques immuno (ex : Ac anti- récepteur à la calcitonine).

Mode d'action : dans la zone sub-ostéoclastique, processus en 2 temps :

- 1) Déminéralisation : acidification du compartiment par une pompe à protons (processus actif avec ATP) → relargage de Ca^{2+} et PO_4^- dans la circulation.
- 2) Dégradation de la matrice protéique par les protéases (*les protéases peuvent donc être utilisées comme marqueur de l'activité ostéoclastique*) :
 - Cathepsine (surtout cathepsine K) = protéases à cys-lysosomale (cystéine protéase)
 - Métalloprotéases matricielles = MMP

Les 2 protéases, cathepsine et MMP, se différencient par les fragments peptidiques obtenus après leur action. L'utilisation, lors de tests biochimiques, d'anticorps spécifiques à ces fragments peptidiques, peuvent amener à des résultats ne reflétant pas la réalité s'ils ne sont spécifiques que pour les fragments obtenus avec une des deux protéases.

Rappel : la fabrication de la matrice vient avant la minéralisation lors de la formation osseuse, donc c'est l'inverse pour la destruction osseuse (déminéralisation avant la dégradation de la matrice).

H) Ostéoblastes

C'est une cellule mononucléée, proche des fibroblastes, issues des cellules souches mésenchymateuses qui peuvent se différencier en :

- Myoblastes (MyoD),
- Chondroblastes (Sox9),
- Adipocytes (PPAR γ = Peroxisome proliferator-activated receptor gamma),
- Précurseurs ostéoblastiques (CBFA 1 = core binding factor 1)

NB : entre parenthèses ce sont les marqueurs qui permettent de les différencier mais ils ne sont pas à retenir.

Les précurseurs ostéoblastiques mûrent en ostéoblastes matures qui expriment :

- Collagène de type I
- Phosphatase alcaline (*Marqueur augmenté pour des pathologies du foie (cholestase), et de l'os. Un enfant en pleine croissance peut avoir de la Phosphatase alcaline augmenté.*)
- Ostéocalcine
- Sialoprotéines osseuses

Alignés sur le tissu ostéoïde, ils ont 3 devenir :

- Ils peuvent être « **emmurés** » et devenir alors des **ostéocytes** (a)
- Des **cellules bordantes** (capables de protéger la fraction osseuse minéralisée contre les ostéoclastes) (b)
- **Mourir par apoptose** (c)

Cellules bordantes
b



a
ostéocytes

1) RANK et RANK-L (L : ligand)

Ce récepteur (RANK) est porté par les précurseurs ostéoclastiques, il transmet un message à l'intérieur de la cellule. Il lie RANK-L qui existe à la surface des précurseurs ostéoblastiques.

L'interaction entre ostéoblastes (OB) et ostéoclastes (OC) permet aux précurseurs ostéoclastiques de se différencier vers la résorption.

Cette interaction se fait grâce à la présence d'une protéine transmembranaire sur le précurseur ostéoclastique, appartenant à la famille des R au TNF : RANK = Receptor Activator of Nuclear Factor κ B (R activateur du facteur nucléaire kappa B).

RANK peut se lier à **RANK-L** (ligand) qui existe à la surface des **ostéoblastes** (et qui appartient à la même famille). Donc il faut une interaction entre OC et OB pour qu'il y ait activation des OC.
(RANK-L sur l'ostéoblaste // RANK sur le pré-ostéoclaste)

Les liaisons de RANK à RANK-L et de M-CSF (macrophage colony stimulating factor) sur son récepteur entraînent prolifération et différenciation des précurseurs ostéoclastiques en ostéoclastes activés.

Un certain nombre de facteurs interviennent lors de cette interaction entre RANK et RANK-L :

- 17- β -oestradiol : inhibe la production de RANK-L et donc diminue la différenciation des précurseurs en ostéoclastes et la résorption avec. C'est un facteur de protection osseuse, ce qui explique les problèmes de fragilité osseuse après la ménopause.
- Parathormone : stimule la P° de RANK-L et donc augmente la résorption.

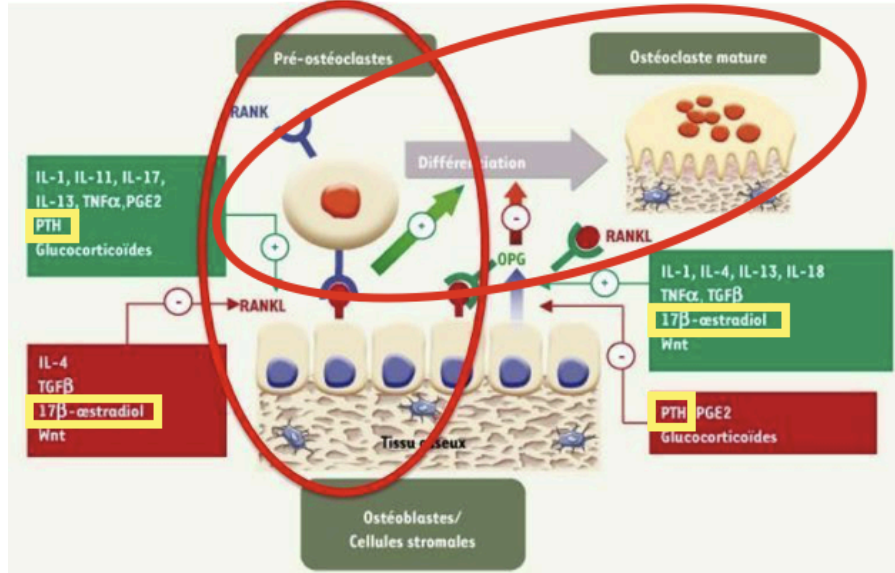
2) OPG = Ostéoprotégérine

Autre membre de cette famille de récepteur au TNF, elle est soluble (non fixée) et peut aussi se fixer sur RANK-L, inhibant son interaction avec RANK et donc la différenciation ostéoclastique.

NB : c'est une compétition au niveau du RANK-L

OPG est donc un inhibiteur de la résorption osseuse. Les facteurs qui augmentent la résorption osseuse tels que PTH (parathormone) agissent en augmentant le taux de RANK-L ou en abaissant celui d'OPG. Et inversement pour les œstrogènes par ex: Une carence en œstrogènes chez une femme âgée va favoriser la résorption osseuse.

Rq : si insuffisance rénale, pas assez de vit D et donc pas assez de calcium, peut aussi expliquer la résorption osseuse. +++ sur schéma signifie une accélération de la différenciation

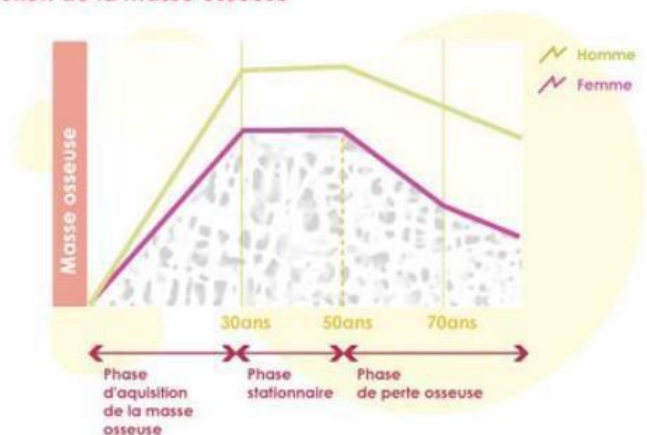


1) Masse osseuse

Il y a plusieurs phases :

- Acquisition de masse osseuse : 0-30 ans : fabrication d'os, dans l'enfance et l'adolescence (Période de croissance dont la fin est discutée).

Évolution de la masse osseuse



- Phase stationnaire, de stabilisation : 30-50 ans = masse osseuse ne varie pas beaucoup.
- Phase de perte osseuse : > 50 ans : différence homme/femme => la masse osseuse de l'homme est supérieure.

J) Définitions

OSTEOPOROSE : défaut harmonieux (global) de l'ensemble des constituants de l'os (minéraux et organiques) aboutissant à une raréfaction de la masse osseuse. (Diminution de la masse dans sa partie protéique ET minérale !!). C'est la pathologie osseuse la plus fréquente.

OSTEOMALACIE : défaut de minéralisation de la matrice osseuse organique (tissu ostéoïde). C'est donc un os déformable (ici quantité de matrice normale).

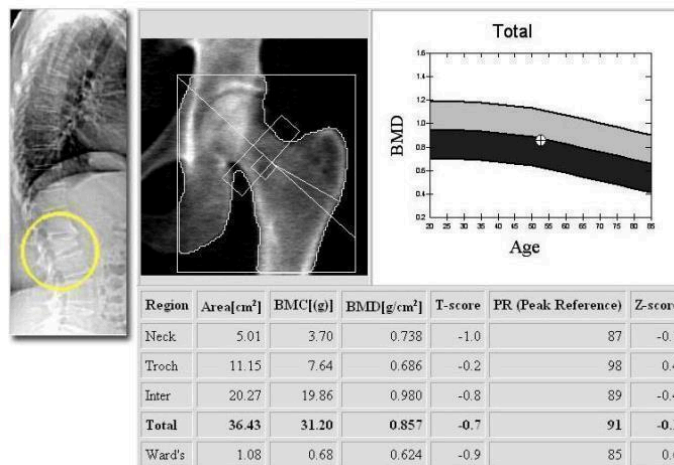
Elle ne touche pas l'ensemble des constituants ** Pas du tout les mêmes conséquences, à bien différencier !

RACHITISME : retard de croissance (différent de l'ostéoporose qui entraîne plutôt des fractures).

Exploration osseuse classique : **OSTEODENSITOMETRIE (ODM)** : examen médical qui permet de mesurer la densité de l'os, c'est-à-dire son contenu minéral. C'est un examen diagnostique. Il s'agit de la mesure d'une densité minérale osseuse surfacique (exprimée en g/cm^2). Les hyperdensités osseuses sont possibles mais très rares, d'où l'intérêt ciblé sur l'hypodensité osseuse et la déminéralisation.

D'après les recommandations de l'ANAES, l'évaluation indirecte de la densité osseuse doit être réalisée au niveau de 2 sites de mesure : le rachis lombaire et l'extrémité supérieure du fémur (col fémoral).

Score ramené à la pop moyenne → biais par la technique + selon la population de référence.



Depuis longtemps on étudiait par radio le métabolisme osseux car on manquait de marqueurs biochimiques.

Résultats de l'ODM : la densité osseuse (DMO) est comparée à celle d'une population d'adultes âgés de 30 à 40 ans. La différence entre la mesure réalisée chez un individu et la moyenne de cette population de référence est ce qu'on appelle le T-score, valeur exprimée en nombre d'écart-types.

- Normal : T-score > -1 : densité osseuse mesurée est supérieure à la moyenne des densités osseuses de réf, moins un écart type.
- Ostéopénie : -2,5 < T-score < -1 : densité osseuse mesurée est située entre la moyenne de référence moins un écart type et la moyenne moins 2,5 écarts-types.
- Ostéoporose : T-score < -2,5 : densité osseuse mesurée est inférieure ou égale à la moyenne de réf moins 2,5 écarts-types.

- Ostéoporose sévère : T-score < -2,5 et présence d'une ou plusieurs fractures de fragilité (consécutives à un traumatisme léger).

Une autre valeur figurant sur les comptes rendus d'ODM est le Z-score qui correspond à la différence entre la mesure réalisée chez un individu et la moyenne des sujets du même âge et du même sexe. C'est plus précis.

II) Les marqueurs biochimiques de la résorption osseuse

→ Les témoins de la dégradation du collagène et les témoins de l'activité ostéoclastique.

A) Témoins de la dégradation du collagène

La trame extracellulaire se dégrade durant la **résorption osseuse** ; on peut mesurer la déminéralisation en mesurant le calcium.

1) Calcium urinaire

Marqueur simple de la dégradation osseuse. Reflet classique de la résorption osseuse, il est utilisé depuis longtemps : premier marqueur utilisé.

La mesure se fait sur les 1ères urines du matin, corrigée de la créatinine. **Peu sensible, peu spécifique**. Ce n'est pas le meilleur paramètre.

2) Hydroxyproline urinaire libre et totale

C'est le reflet de la dégradation du collagène dont elle représente 15% des AA. Comme 90% sont réabsorbés par le rein, seulement 10% de la production par résorption osseuse sont retrouvées dans les urines (perte de sensibilité).

Mais cette mesure est **peu spécifique**, car le fragment C1q du complément peut représenter jusqu'à 40% du taux d'hydroxyproline urinaire. De plus, l'hydroxyproline existe aussi dans l'alimentation ce qui impose des conditions diététiques spécifiques avant les dosages (ce qui n'est pas évident avec des patients non hospitalisés).

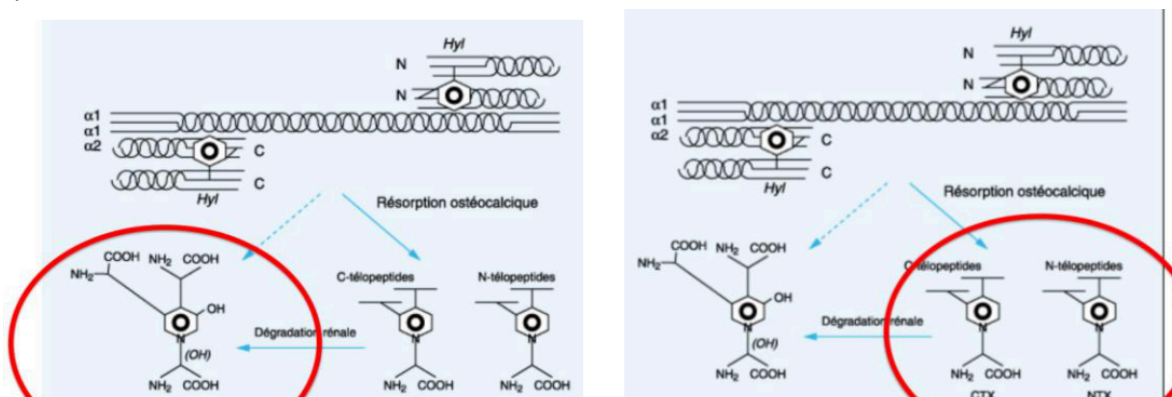
3) Molécules de pontage du collagène (Ddp et Pyd)

Surtout **Dpd** (= désoxypyridinoline) car la **Pyd** (= pyridinoline) existe dans d'autres tissus (cartilage, vaisseaux, ligaments, intestin, muscles). Ces molécules de pontage du collagène sont libérées dans le sang par dégradation du collagène, le passage dans les urines est libre pour 40% et lié (à des peptides) pour 60%.

Quand il y a dégradation de la trame, ces molécules sont libérées ; certaines libres, certaines sont encore liées à des peptides qui sont des morceaux de la chaîne de collagène dont elle est issue. En effet, il y a des enzymes plus ou moins spécifiques, donc des produits de dégradation plus ou moins fins.

Intérêt : pas d'influence de l'alimentation.

Techniques : HPLC (chromatographie liquide à haute performance, plus précis) ou immunodosages par Ac anti-Dpd.



4) Fragments télopeptidiques N et C terminaux du collagène de type I :

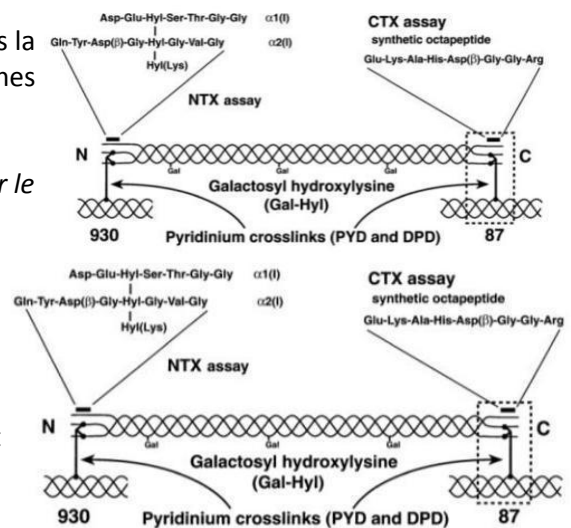
Les fragments télopeptidiques N et C terminaux du collagène de type I ne sont pas associés en hélice : ils sont situés aux extrémités de la triple hélice. Il existe différents kits de dosage (différentes “trousses”).

- Trousse NTX : Ac dirigé contre un peptide N terminale dans la région des X-links (produit majoritaire dans les urines d’adolescents)

★ Ces peptides (pp) sont produits par action de la cathepsine K sur le collagène, et sont liés ou non à des molécules de pontage

Presque spécifiques (collagène cutané)

- 2 trousses CTX
- Trousse CTX-MMP : un télopeptide obtenu par dégradation du collagène par une collagénase bactérienne, contenant de la Pyl et du ppCt (ICTP = carboxy terminal type I collagene telopeptide) a permis de produire un Ac.



Ce pp n’est pas produit par la cathepsine, mais par les MMP

- CTX : Ac fabriqué à partir d’une séquence connue de la partie CT des chaînes à du collagène de type I : Glu-Lys-Ala-His-Asp-Gly-Gly-Arg (pas à retenir)
- Trousse CTX pour carboxy terminal X-linked telopeptide type I collagene.
- Produit par la cathepsine K.

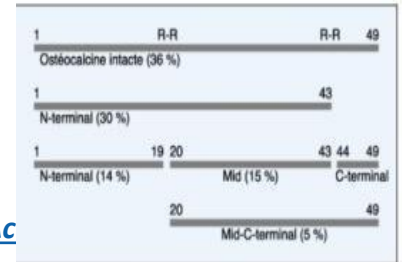
C’est la partie située aux deux extrémités de la triple hélice de collagène. On a fabriqué des anticorps qui permettent de faire des réactions d’immunodosage pour doser ces fragments.

1. On a pris des urines d’adolescents, et on a trouvé des peptides. S’ils étaient souvent retrouvés, on a pensé qu’ils étaient peut-être systématiquement coupés lors de la dégradation. Donc on a fabriqué des Ac contre ces peptides. Il s’agit d’un peptide N-terminal dans la région des cross-links (X-links), donc on a appelé cet Ac la trousses NTX. Ces peptides sont produits par action de la cathepsine K sur le collagène, et sont liés ou non à des molécules de pontage. Presque spécifiques (collagène cutané).
2. On prend du collagène et on le fait dégrader par une collagénase bactérienne connue. On obtient des produits de dégradation (ICTP = carboxy terminal type I collagène telopeptide) contre lesquels on fabrique un Ac. Celui-ci dépeçait des peptides contenant de la pyridinoline et du peptide C-terminal.

Comme c’est fabriqué par des métalloprotéinases (MMP) et non par la cathepsine, on parle de trousses CTX-MMP.

3. Ac fabriqué contre un peptide d’une séquence connue (partie C-terminal des chaînes alpha du collagène de type I : Glu-Lys-Ala-His-Asp-Gly-Gly-Arg) qu’on savait contenue dans la séquence télopeptidique. Trousse CTX (carboxy terminal X-linked telopeptide type I collagene). Produit par cathepsine K. (NTX pour la partie N-terminale de la molécule de collagène, et CTX pour la partie C-terminale mais on devrait normalement

trouver la même quantité pour les 2). Selon les troussees utilisées, les taux de dégradation sont différents. Technique en amélioration.



B) Activité ostéoclastique

1) RANK-L et OPG Dosage Elisa dans le sérum par des Ac

+++

Dosages ELISA dans le sérum par des Ac monoclonaux dirigés contre ces molécules. On a pu mettre en évidence une corrélation inverse entre RANK-L et le 17-bêta-oestradiol, et une corrélation positive entre OPG et 17-bêta-oestradiol

Le ratio RANK-L / OPG s'élève en cas d'augmentation de l'activité ostéoclastique → *Ce paramètre n'est pas encore utilisé en clinique à l'heure actuelle.*

2) Phosphatase Acide Tartrate Résistante (TRACP)

La Phosphatase Acide Tartrate Résistante (TRACP) est un marqueur de l'activation des ostéoclastes.

Sur les 5 isoformes de phosphatase acide (P Ac), seule la 5 n'est pas inhibée par l'acide tartrique. Sur les 2 formes de 5, a et b, la 5b provient majoritairement des ostéoclastes. On a donc produit des Ac anti- P Ac 5b pour des mesures dans le sérum. Pour l'instant, utilisé avec intérêt dans les métastases osseuses (évaluation de leur activité), c'est encore rare mais ça existe. Reflet direct de l'activité ostéoclastique +++

3) Cathepsine K

La cathepsine K appartient à la famille des protéases à Cys, est très fortement exprimée dans les ostéoclastes et intervient dans leur multiplication. Ce n'est pas fait en routine, mais fréquemment dans le cadre de la recherche.

III) Les marqueurs biochimiques de la formation osseuse

A) Phosphatase alcaline

Le rôle de la phosphatase alcaline dans la minéralisation est mal connu (c'est l'inverse de la P.Acide). C'est une glycoprotéine avec des isoformes surtout hépatiques et osseuses.

C'est une ectoenzyme qui agit à l'extérieur de la cellule pour la minéralisation, en hydrolysant les esters de phosphates PO₄⁻ et les pyrophosphates (qui inhibent la minéralisation) et en transportant le P.

On fait la mesure par dosage colorimétrique pour la phosphatase alcaline totale mais faible spécificité et sensibilité donc mise au point de dosages spécifiques de l'isoforme osseuse, par électrophorèse ou Ac monoclonal (mais qui croise pourtant avec la forme hépatique).

/!\ sur bilan : si augmentation des P alcalines chez le jeune, ce n'est pas forcément dû à l'alcoolisme mais peut être simplement à la formation osseuse (+++ à ces âges). Dosage de base, mais de moins en moins utilisé.

B) Ostéocalcine sérique

L'ostéocalcine sérique appartient aux Gla-protéines (modifications post-traductionnelles), c'est la plus abondante dans l'os. C'est un monomère de 49 AA, issu du clivage de la pré-pro-ostéocalcine en peptide signal + pro-ostéocalcine.

Celle-ci est gamma-carboxylée en ostéocalcine mature, qui est alors sécrétée dans la matrice par l'ostéoblaste. Une partie passe dans la circulation, libre ou clivée en différents fragments, ce qui rend le dosage difficile, même s'il apparaît très spécifique. Rôle mal connu.

On peut la retrouver dans la circulation sous forme de 43 AA, ou bien d'autres formes. Donc cela gêne les dosages par Ac monoclonal. Si on réussit à le faire, c'est bien, on peut suivre qq1 ainsi ; c'est le reflet de la formation osseuse.

C) Peptides d'extension du collagène de type I

Ce sont des domaines globulaires synthétisés dans le REG aux extrémités du collagène de type I, et clivés à l'extérieur de la C en propeptide N et C terminaux : PINP et PICP (pro-collagène type I N-terminal peptide et C-terminal peptide). Il est proportionnel à la production de collagène.

Ils joueraient un rôle dans l'assemblage des fibrilles de collagène.

Il existe des méthodes pour dosage effectuer un dosage sanguin, reflet de l'activité ostéoblastique.

IV) Variabilité des marqueurs biochimiques du remodelage osseux

A) Variabilités contrôlables

- a. Méthode : en général < 10% de variabilité
 - b. Pré analytique (prélèvement et conservation) :
 - Sang : matin à jeun entre 8h et 10h (variation au cours du nycthémère)
 - Urines :
 - Des 24h → dosage d'une activité globale, mais problème du recueil de la totalité des urines (l'urine des 24h est difficile à avoir). *Initier les 24h après un vidange complète de la vessie : à exclure du dosage, et après top chrono c'est parti pour 24h.*
 - La première miction est à corriger par la créatinine et à faire à jeun.
- La conservation doit se faire au froid pour prévenir la dégradation enzymatique, par ex très élevée pour l'ostéocalcine en 2h (+4°C pour 24h, mais bcp plus froid si plus longtemps : -20 ou -80°C).

Attention :
 - Ostéocalcine → sur échantillons jamais décongelés avant
 - Ostéocalcine et TRACP sensibles à l'hémolyse
 - Pyridinoline sensible aux UV.

- c. Variations nycthémérales et alimentaires : ces facteurs montent la nuit (entre 4 et 8h) et baissent en fin d'après-midi. On pense que ceci est lié aux cycles du cortisol et de la PTH
 + également l'effet des aliments riches en Hyp (hydroxyproline) (viande, gélatine) par ex.
- d. Activité physique : en particulier qui sollicite les os porteurs (ex : course à pied) → augmente le taux de marqueurs. Ne pas courir avant de faire le dosage.

B) Variabilités non contrôlables

Âge : augmentation chez l'enfant et l'adolescent parallèlement à la croissance. Baisse chez l'adulte puis stable jusqu'à la ménopause chez la femme et 70 ans chez l'Homme (approximatif). Remontée chez la femme ménopausée (50 à 100%) !

Maladie ou TTT associés : diabète, pathologies thyroïdiennes, polyarthrite rhumatoïde, arthrose, fracture récente, insuffisance rénale et hépatique sont des situations pouvant influencer les marqueurs du remodelage osseux. ⚠ Attention aux médicaments/compléments alimentaires/ tisane pris par le patient.

V) Utilité clinique des marqueurs biochimiques du remodelage osseux

Est ce que c'est utile pour le diagnostic de l'ostéoporose ? NON ! *** (diagnostic clinique +/- radio+ raison économique (faudrait le faire à toutes les femmes ménopausées).

Estimation du risque de fractures? OUI (ex : en cas d'ostéopénie à la DMO sans ATCD de fracture).

Mais aussi pour :

- le suivi des TTT anti-ostéoporotiques et du bénéfice sur les fractures.
- +/- améliorer l'observance du TTT. Utilité importante quand on suspecte une mauvaise observance.
- A Brest, peu utilisé en rhumato

VI) Utilité intellectuelle des marqueurs du remodelage osseux

Permet de comprendre les nouveaux TTT :

- **OPG** est à l'essai depuis des années (10 ans), dans le but de préserver de la résorption osseuse
- **Denosumab** : anticorps monoclonal contre RANK-L. Il est en vente. (Recommandation par la HAS : TTT de 2ème intention en relais d'un ttt par biphosphonates chez les patientes atteintes d'ostéoporose)
 - Ces 2 produits ont le même effet, mais l'Ac a une demi-vie plus longue.
 - Indiqués dans les cas suivants :
 - Ostéoporose masculine à haut risque de fracture
 - Ostéoporose post-ménopausique chez la femme à haut risque de fractures
 - Ostéoporose sous corticothérapies à haut risque de fractures
 - Perte osseuse dans le cancer de la prostate, traitement associé (de la)
- **Ranélate de strontium** : abaisse l'expression de RANK-L et augmente celle d'OPG, tout en stimulant la prolifération des ostéoblastes. Indications restreintes au ttt de l'ostéoporose sévère à risque élevé de fracture, en dernière intention.
 - ✗ Arrêt de commercialisation en raison de ses effets secondaires cutanés et cardiovasculaire.
- **Inhibiteurs spécifiques de la cathepsine K** : odanacatib et balicatib (encore à l'état de recherche.)

VII) QCMs

1. A propos de la physiologie des os :

- A. Le squelette a 3 rôles : mécanique, métabolique et cellulaire.
- B. L'os cortical représente 20% de la masse du squelette.
- C. La désoxypyridinoline est un marqueur du remodelage osseux.
- D. Le renouvellement osseux est un cycle permanent qui assure le remplacement de 20% du squelette par an.
- E. Toutes les propositions précédentes sont fausses

Réponses :

- A. Vrai.
- B. Faux : 80%, il s'agit de l'os trabéculaire qui représente 20% de la masse du squelette.
- C. Vrai : il est plus utilisé (70%) que la pyridinoline (30%).
- D. Faux : 10% ++.
- E. Faux.

2. A propos de la physiologie des os :

- A. L'ostéocalcine sérique est un marqueur de la résorption osseuse
- B. Très spécifique et très sensible, le dosage du calcium urinaire est un marqueur de choix pour évaluer la résorption osseuse.
- C. L'activation des ostéoclastes nécessite une interaction entre ostéoclaste et ostéoblaste via le récepteur RANK et son ligand (RANK-L).
- D. Les marqueurs biochimiques du remodelage osseux ont un intérêt majeur pour le diagnostic de l'ostéoporose.
- E. Toutes les propositions précédentes sont fausses

Réponses :

- A. Faux. C'est un marqueur de FORMATION osseuse

B. Faux. Le calcium urinaire est bien un marqueur de la résorption osseuse, cependant il est peu spécifique. Il est préférable d'utiliser d'autres marqueurs comme les fragments télépeptidiques N et C terminaux du collagène de type I

C. Vrai.

D. Faux. Le diagnostic de l'ostéoporose repose dans un premier temps sur la présentation clinique mais surtout sur les clichés radiographiques d'ostéodensitométrie.

E. Faux.