



**HAL**  
open science

# Étude de la réparation osseuse dans un modèle de souris urémiques sauvages et invalidées pour le gène de l'Apolipoprotéine E

Emma Perbos

## ► To cite this version:

Emma Perbos. Étude de la réparation osseuse dans un modèle de souris urémiques sauvages et invalidées pour le gène de l'Apolipoprotéine E. Médecine humaine et pathologie. 2015. dumas-01223845

**HAL Id: dumas-01223845**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01223845>**

Submitted on 3 Nov 2015

**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.

UNIVERSITE DE BORDEAUX

Année 2015

Thèse n°3050

THESE POUR L'OBTENTION DU  
DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN MEDECINE  
D.E.S. de NEPHROLOGIE

Présentée et soutenue publiquement

Le 26 juin 2015

Par Emma PERBOS

Née le 14 novembre 1986 à Toulouse

ETUDE DE LA REPARATION OSSEUSE DANS UN MODELE DE SOURIS  
UREMIQUES SAUVAGES ET INVALIDEES POUR LE GENE DE  
L'APOLIPOPROTEINE E

**Membres du jury**

Monsieur le Professeur C. COMBE

Président

Monsieur le Professeur P. MERVILLE

Examineur

Monsieur le Professeur Z. MASSY

Rapporteur

Madame le Docteur C. RIGOTHIER

Examineur

Madame le Docteur J. AMEDEE

Directeur

# REMERCIEMENTS

## **Pr Ziad Massy,**

Je vous remercie de votre intérêt pour ce travail, de m'avoir permis de me former aux techniques chirurgicales dans votre unité. Merci enfin pour votre disponibilité, je suis très honorée que vous ayez accepté de juger cette thèse.

## **Pr Christian Combe,**

Je vous remercie pour vos conseils, vos enseignements et votre confiance. Merci de m'avoir permis de réaliser ce travail de master et de m'avoir orientée vers l'unité BioTis.

## **Pr Pierre Merville,**

Merci pour vos enseignements ; c'est dans votre service que j'ai appris la rigueur et le travail d'interne, je vous en suis très reconnaissante.

## **Dr Claire Rigothier,**

Merci d'avoir accepté de juger ce travail, je suis ravie d'avoir l'opportunité de pouvoir travailler avec toi de nouveau.

## **Dr Joëlle Amédée,**

Merci de m'avoir accueillie dans l'unité durant cette année, et de m'avoir laissé autant de liberté dans le travail. J'étais très attirée par le monde de la recherche, et vous m'avez permis de le découvrir dans les meilleures conditions possibles, entourée d'une équipe dynamique, dans une ambiance extraordinaire. Merci pour votre disponibilité, votre enthousiasme et vos encouragements.

## **Aux membres de l'unité Inserm 1026 BioTis :**

Reine Bareille, reine de la culture cellulaire et de l'organisation ; Sylvie Rey, dont j'admire la patience en salle d'histologie ; Olivier Chassande, Sylvain Catros, Silke Schlaubitz, pour leur aide en expérimentation animale et en imagerie.

Camille, Julien, Hugo, Audrey, pour leurs précieux conseils ; ainsi que Juliette, Carole, Agathe, Bruno, Annabelle, Damien, Robin et Patrick, pour l'ambiance, les quizz, les caïpi et les tournois de Molky.

Laetitia Medan et Myriam Touati.

Sabrina Poirot, qui a eu la gentillesse et la patience de me former aux techniques chirurgicales à Amiens et de répondre à mes questions par la suite.

Max, pour avoir pris le temps de mettre le nez dans mes tableurs.

**Aux médecins** des différents services qui m'ont accueillie et formée durant ces quatre années d'internat,

A l'équipe de l'HDJ, pour leur accueil et leur amitié,

**Ma famille et mes amis,**

Mes parents, ma sœur, mon frère, mes grands-parents ; comment vous remercier... Pour votre amour, votre soutien indéfectible, toujours attentifs, curieux, de bon conseils.

Je remercie plus particulièrement ma mère pour sa sensibilité, son écoute et ses conseils avisés ; mon père qui a su au bon moment me faire découvrir le Carbonnieux et le discours de la servitude volontaire.

François, mon marin d'eau douce,

Aurélia, Élodie, douze ans déjà d'amitié, de soirées, week-end et vacances qui m'ont toujours permis de garder les pieds sur terre,

Mes collocs, Sandrine, Marjo, Sophie, et Cynthia, vous êtes ma deuxième famille ; Ben, Raphaëlle ; Anne-Line, Charlotte, Christelle, pour les longues pauses à la manu' les nombreux fous-rires passés et j'espère à venir ; Max et Agathe, pour avoir formé le meilleur G3 ever, et m'avoir permis de résister à la folie Chapiron.

Mes bordelo-cestadais préférés, Charlie, Gary, Arnaud, Glagla, mais aussi Katoucha, Mélanie et Hiba, rayons de soleil de mes semestres d'internat,

Elisa, le meilleur coach,

Mathilde, Pauline, Camille, si différentes, toutes merveilleuses par votre humanité, votre curiosité, votre sérieux dans le travail et capacité à faire la fête ; Aurore, Anne-Lise, Julien et les Guillaumes,

Et puis également Benj, Emilie-Chaton, Josette, le Gayon, Didier, Pablo, Svirmickas, Sébastien (vivement la prochaine campagne électorale), Adélaïde et Eline.

Mes grandes cousines Nathalie et Anne, pour votre accueil à Bordeaux, je suis ravie d'avoir eu cette chance de me rapprocher de vous.

## TABLE DES MATIERES

Abréviations .....	1
I. La Maladie Rénale Chronique (MRC) .....	2
II. Troubles minéraux et osseux associés à la maladie rénale chronique (TMO-MRC).....	5
A. Présentation .....	5
1. Définition.....	5
2. Physiopathologie des perturbations du métabolisme minéral au cours de la MRC ....	5
3. Ostéodystrophie rénale .....	11
a. Classification anatomopathologique.....	11
b. Physiopathologie.....	12
c. Outils diagnostiques.....	14
4. Calcifications vasculaires .....	15
B. Expression clinique et prise en charge thérapeutique .....	18
1. Morbidité et mortalité liée aux TMO-MRC .....	18
2. Prise en charge thérapeutique des TMO-MRC.....	20
a. Etat des connaissances et recommandations de bonne pratique .....	20
b. Evolution et prise en charge des troubles du métabolisme osseux après transplantation rénale .....	25
C. Modèles expérimentaux .....	30
a. Modèle murin ApoE-/-.....	30
b. La réparation osseuse.....	31
III. Objectifs .....	34
IV. Article.....	35
V. Discussion et perspectives.....	54
1. Les modèles expérimentaux d'insuffisance rénale et de troubles du métabolisme minéral et osseux utilisés dans notre étude. ....	54
2. La réparation osseuse dans ces modèles expérimentaux.....	55
3. Conclusion.....	56
VI. Références .....	58

## TABLE DES ILLUSTRATIONS

<u>Figure 1</u> : Régulation endocrine du métabolisme minéral .....	6
<u>Figure 2</u> : Physiopathologie des troubles du métabolisme Minéral associés à la Maladie Rénale Chronique .....	9
<u>Figure 3</u> : Cinétique de perturbation des différents acteurs du métabolisme minéral au cours de la Maladie Rénale Chronique.....	10
<u>Figure 4</u> : Etiologies des fractures chez les patients atteints de Maladie Rénale Chronique ..	19
<u>Figure 5</u> : Facteurs influençant le métabolisme osseux en post transplantation rénale .....	26
<u>Figure 6</u> : Processus de réparation d'une fracture fémorale .....	32
<u>Tableau 1</u> : Stades de la maladie rénale chronique .....	3
<u>Tableau 2</u> : Description des quatre types histologiques d'ostéodystrophie rénale selon la classification Turnover Minéralisation Volume .....	12
<u>Tableau 3</u> : Effets des chélateurs du phosphate sur la mortalité, les calcifications vasculaires et le métabolisme minéral.....	23
<u>Tableau 4</u> : Synthèse des thérapeutiques disponibles pour les TMO-MRC post-transplantation rénale, effets sur la parathormone et la densité minérale osseuse. ....	29

## ABREVIATIONS

1,25 vit D<sub>3</sub> : 1,25 dihydroxyvitamine D<sub>3</sub>

ApoE : Apolipoprotéine E

ApoE<sup>-/-</sup> : invalidation pour le gène de l'apolipoprotéine E

AVK : Antagonistes de la vitamin K

BMP : Bone Morphogenic Protein

Ca : Calcium

CaSR : Récepteur Sensible au Calcium

DFG : Débit de Filtration Glomérulaire

DMO : Densité Minérale Osseuse

DXA : *Dual-energy X-ray Absorptiometry* ou Absorptiométrie biphotonique à rayons X

eGFR : *estimated Glomerular Filtration Rate*

FDRCV : Facteurs de Risque Cardiovasculaires

FGF23 : *Fibroblast Growth Factor 23*

FGFR : récepteur au FGF

ERA-EDTA : *European Renal Association-European Dialysis and Transplant Association*

KDIGO : *Kidney Disease : Improving Global Outcome*

M-CSF : *Macrophage- Colony Stimulating Factor*

MDRD : *Modification of the Diet in Renal Disease*

MGP : *Matrix-Gla-Protein*

MRC : Maladie Rénale Chronique

MSC : Cellule souche mésenchymateuse

IGF1 : *Insulin-like Growth Factor 1*

IRC : Insuffisance Rénale Chronique

IRCT : Insuffisance Rénale Chronique Terminale

Pi : Phosphate

PTH : Parathormone

RANK-L : *Receptor Activator of NF- $\kappa$ B Ligand*

REIN : Réseau Epidémiologie et Information en Néphrologie

RR : Risque Relatif

sFRP4 : *secreted Frizzled-Related Protein 4*

SOST : sclerostine

TGF  $\beta$  : *Transforming Growth Factor  $\beta$*

TMO-MRC : Troubles Minéraux et Osseux associés à la Maladie Rénale Chronique

VDR : *Vitamin D Receptor* ou Récepteur à la vitamine D

VDRA : Analogues de la vitamine D active

VLDL : *Very Low Density Lipoprotein*

VSMC : Cellule Musculaire Vasculaire lisse

Wnt : *wingless integration site* (voie de signalisation)

## I. LA MALADIE RENALE CHRONIQUE (MRC)

La maladie rénale chronique est définie par la présence, pendant plus de 3 mois, de marqueurs d'atteinte rénale ou d'une baisse du débit de filtration glomérulaire (DFG) au-dessous de 60 mL/min/1,73 m<sup>2</sup>. Les marqueurs d'atteinte rénale peuvent être des anomalies morphologiques, histologiques, ou biologiques : protéinurie, albuminurie, hématurie, leucocyturie.

En pratique clinique, la société de néphrologie recommande d'estimer le débit de filtration glomérulaire par l'utilisation de la formule de MDRD (Modification of the Diet in Renal Disease) simplifiée, en se basant sur le dosage de la créatinine par spectrométrie de masse. De manière alternative, le débit de filtration glomérulaire peut être mesuré grâce à l'utilisation de marqueurs exogènes (inuline, radio pharmaceutiques, iohexol). Ces traceurs ne sont pas sécrétés ni réabsorbés par les tubules et ne sont pas métabolisés. Leur clairance rénale est donc égale au DFG. L'étude de la clairance de ces marqueurs constitue la méthode de référence pour déterminer le DFG, cependant ces techniques sont complexes et coûteuses, et ne peuvent être utilisées en routine. Elles sont réservées à des situations cliniques particulières, où l'estimation du DFG par la créatininémie peut être biaisée (dénutrition sévère, obésité, nutrition parentérale prolongée ; augmentation ou diminution de la masse musculaire, ou encore insuffisance hépatocellulaire sévère) (1).

La MRC est classée en 5 stades de sévérité, définis dans le Tableau 1.



Stade	DFG estimé (mL/min/1.73m <sup>2</sup> )	Définition
1	≥90	Maladie rénale chronique <sup>(a)</sup> avec DFG normal ou augmenté
2	entre 60 et 89	Maladie rénale chronique <sup>(a)</sup> avec DFG légèrement diminué
3a	entre 45 et 59	Insuffisance rénale chronique modérée
3b	entre 30 et 44	
4	entre 15 et 29	Insuffisance rénale chronique sévère
5	<15	Insuffisance rénale chronique terminale

<sup>(a)</sup> *Présence de marqueurs d'atteinte rénale.*

Tableau 1 : Stades de la maladie rénale chronique. Issu de (1).

La progression d'une maladie rénale chronique va conduire d'une part à une rétention de toxines, notamment de toxines dérivées du catabolisme azoté ; mais également va perturber la régulation du bilan hydro électrolytique, de l'équilibre acido-basique, et altérer les fonctions endocrines rénales (synthèse de rénine, d'érythropoïétine et de vitamine D active) (2). En conséquence, on observe de à partir du stade 3b de la MRC (3) :

- une hypertension artérielle, essentiellement volo-dépendante,
- une anémie mixte : inflammatoire, par carence martiale et carence en érythropoïétine,
- une acidose métabolique, liée à la dysfonction tubulaire, qui contribue à la morbidité-mortalité de la MRC en favorisant le catabolisme protidique, diminuant la synthèse d'albumine, et en favorisant la résorption osseuse. L'acidose métabolique constitue également un facteur de progression de la MRC.
- les troubles du métabolisme minéral et osseux (voir partie II).

Les étiologies de l'IRCT en France sont nombreuses ; le diabète, l'hypertension artérielle et les glomérulopathies primitives constituent les causes les plus fréquentes d'insuffisance rénale terminale (rapport REIN (4)).

Par sa fréquence dans la population française et son retentissement, la MRC est un problème de santé publique. Le rapport Réseau Epidémiologie et Information en Néphrologie (REIN), édité par l'Agence de Biomédecine, fait état chaque année de l'épidémiologie de l'insuffisance rénale chronique terminale (IRCT) traitée dans la population française. Le rapport concernant l'année 2012 estime la prévalence brute de l'IRCT traitée à 1 127 personnes par million d'habitants. Cette prévalence augmente de 4% par an : environ 40900 personnes étaient traitées par épuration extrarénale en France en 2012 et 32 500 étaient porteuses d'un greffon rénal (4). A l'échelle mondiale, environ 440000 patients débutent chaque année un traitement de suppléance rénale, mais 3200000 personnes n'y ont pas accès, et décèdent prématurément des conséquences de l'insuffisance rénale terminale (5).

Le coût humain de l'IRCT est particulièrement élevé en termes de morbidité-mortalité et d'impact sur la qualité de vie du patient. Les données du registre européen ERA-EDTA (European Renal Association-European Dialysis and Transplant Association), montrent que les patients traités pour une IRCT et âgés de 65 à 74 ans, soit la classe d'âge la plus représentée, ont une espérance de vie inférieure de 50% par rapport à la population générale de même âge. La mortalité cardio-vasculaire (mort subite, athéromatose, infarctus du myocarde, insuffisance cardiaque) est la première cause de décès chez le patient dialysé ; elle est 10 à 20 fois supérieure à celle de la population générale (5).

Enfin, d'un point de vue médico-économique, la MRC représente une dépense de santé publique importante et en augmentation : le coût de la prise en charge de l'IRCT par l'Assurance Maladie a été estimé en 2007 à 4 milliards d'euros. L'hémodialyse correspondait au traitement de suppléance le plus coûteux, représentant 77% des dépenses (6).

## II. TROUBLES MINÉRAUX ET OSSEUX ASSOCIÉS À LA MALADIE RENALE CHRONIQUE (TMO-MRC)

### A. PRÉSENTATION

#### 1. DÉFINITION

Des anomalies du métabolisme minéral et osseux surviennent chez les patients atteints d'insuffisance rénale chronique. Le terme « ostéodystrophie rénale » était auparavant utilisé pour désigner l'ensemble de ces perturbations. Cependant, devant leur nature hétérogène, une conférence internationale d'experts nommée KDIGO (Kidney Disease : Improving Global Outcome) a publié en 2006 un consensus permettant de définir précisément cette entité, et de proposer des critères diagnostiques permettant d'harmoniser les pratiques (7). Le terme de « Troubles minéraux et osseux associés à la maladie rénale chronique » (TMO-MRC) a été retenu pour désigner cet ensemble, qui est défini comme un désordre systémique du métabolisme minéral et osseux lié à l'insuffisance rénale chronique, se manifestant par un ou plusieurs éléments de la triade suivante :

- Anomalie biologique du taux de calcium, phosphore, de la parathormone (PTH) ou de la vitamine D.
- Anomalie du modelage et remodelage osseux, du volume, ou de la minéralisation osseuse. Perturbation de la croissance osseuse chez l'enfant, et troubles de la résistance osseuse.
- Calcifications vasculaires ou des tissus mous.

#### 2. PHYSIOPATHOLOGIE DES PERTURBATIONS DU MÉTABOLISME MINÉRAL AU COURS DE LA MRC

Le rein, l'os et le tube digestif sont les trois acteurs majeurs du métabolisme minéral (figure 1). Le squelette, formé majoritairement d'hydroxyapatite, représente une large réserve de calcium (Ca) et phosphate (Pi). L'os étant perpétuellement remodelé, il existe un flux permanent de Ca et Pi entre l'os et le secteur extracellulaire. Ces échanges doivent être finement régulés, pour permettre de maintenir stables les concentrations extracellulaires en Ca et Pi, et de garantir des concentrations intracellulaires physiologiques. En effet, leurs fonctions cellulaires sont capitales : le calcium est un messager intracellulaire ubiquitaire, et le phosphate un composant



sensible au calcium (CaSR) est moins stimulé, et on observe une libération de PTH circulante (9). Des travaux récents montrent que la phosphatémie serait un régulateur de la PTH, indépendamment des autres acteurs du métabolisme phospho-calcique (10). Au niveau du tubule proximal rénal, la PTH inhibe l'activité du co-transporteur sodium-phosphate NaPi-IIa. Elle agit également au niveau du tissu osseux en stimulant la synthèse du FGF23 par les cellules osseuses.

Dans les modèles précliniques d'insuffisance rénale, l'hyperparathyroïdie est nécessaire à l'augmentation des taux de FGF23 circulants, et la parathyroïdectomie diminue l'amplitude de cette augmentation (11).

Le Fibroblast Growth Factor 23 (FGF23) est une glycoprotéine qui appartient à la sous-famille du FGF19, également appelée « FGF endocrines » compte tenu de leur caractère circulant et de leurs rôles physiologiques dans la régulation de l'énergie et du métabolisme minéral. Il est sécrété au niveau du tissu osseux par les ostéocytes et les ostéoblastes. La liaison du récepteur au FGF (FGFR) par le FGF23 nécessite la présence d'un co-récepteur,  $\alpha$ Klotho, qui permet d'augmenter son affinité pour le FGFR. Alors que les FGFR sont exprimés de manière ubiquitaire,  $\alpha$ Klotho est exprimé sélectivement dans le tissu rénal et parathyroïdien, qui constituent ainsi les deux organes cibles du FGF23.  $\alpha$ Klotho est une protéine transmembranaire qui peut également être présent dans la circulation sous forme soluble par le biais d'un clivage de sa région extracellulaire, ou bien du fait d'un épissage alternatif.  $\alpha$ -Klotho soluble peut ainsi être retrouvé dans le plasma, l'urine et le liquide céphalo-rachidien.

Les actions du FGF23 au niveau de ces organes cibles peuvent être résumées en trois points :

- inhibition de la réabsorption des ions phosphate par les co-transporteurs sodium-phosphate NaPi-IIa et NaPi-IIb situés au pôle apical des cellules tubulaires proximales,
- diminution de la synthèse de la vitamine D active et majoration de sa dégradation, *via* l'inhibition de la  $1\alpha$ -hydroxylase, et l'augmentation de la  $24\alpha$ -hydroxylase, responsable de la dégradation du calcitriol,
- inhibition de la synthèse et la sécrétion de la parathormone (PTH) par les cellules parathyroïdiennes.

Alpha-Klotho possède également des propriétés indépendantes du FGF23 ou de son récepteur. Il s'agit d'activités enzymatiques de type glucuronidase et sialidase,

permettant de modifier les glycoprotéines membranaires et donc de moduler les phénomènes d'endo ou exocytose de différents canaux ou transporteurs tubulaires comme TRPV5 par exemple (8). De récents travaux montrent que le rein est responsable à la fois de la sécrétion d' $\alpha$ Klotho, et de son élimination. En effet, il subit un passage transépithélial au niveau du tubule proximal lui permettant d'accéder aux protéines transmembranaires situées au pôle baso-latéral avant d'être éliminé (12).

Au cours de la maladie rénale chronique, le métabolisme minéral est perturbé (figure 2). Les dosages de Klotho plasmatique, urinaire ou rénal diminuent chez l'animal, parallèlement au déclin de la fonction rénale (16). La diminution de Klotho membranaire stimule la sécrétion de FGF23 en créant une résistance relative au FGFR (14). L'augmentation du FGF 23 circulant est amplifiée par la diminution des capacités d'excrétion de cette molécule par le rein. Le FGF23 circulant inhibe la réabsorption rénale du Pi, et permet de maintenir une phosphatémie normale aux stades précoces de la MRC (13). Il a également été proposé que le phosphate, en se chélatant avec le calcium, provoque une faible diminution de la calcémie ionisée qui provoquerait une levée d'inhibition par le CaSR au niveau des cellules parathyroïdiennes, permettant la sécrétion de PTH, et la prolifération de ces cellules. L'hyperparathyroïdie secondaire est surtout favorisée par la diminution de la synthèse du calcitriol, liée à la perte néphronique et à son inhibition par le FGF23. Le déficit en vitamine D active limite en effet l'absorption intestinale du Ca, et favorise l'hypocalcémie, qui est perçue par les cellules parathyroïdiennes grâce au CaSR (10). Dans les stades plus avancés de la MRC, la prolifération des cellules parathyroïdiennes peut donner lieu à la formation de nodules hyperplasiques ou d'adénomes, responsables d'une sécrétion autonome de PTH ; on parle d'hyperparathyroïdie tertiaire. L'expression parathyroïdienne des récepteurs au calcium, à la vitamine D (VRD), au FGF23 diminuent, limitant ainsi le rétrocontrôle négatif portant sur la sécrétion de parathormone (14,15).

Enfin, il semblerait que la protéinurie joue un rôle dans la création ou l'aggravation de la rétention en phosphate, de manière indépendante du déclin du DFG : une équipe française a décrit à l'aide de deux modèles précliniques et deux cohortes de patients protéinuriques, une augmentation de l'expression du transporteur NaPi-IIa, et donc de la réabsorption tubulaire proximale de Pi, avec élévation de la phosphatémie et du FGF23 circulant (17).

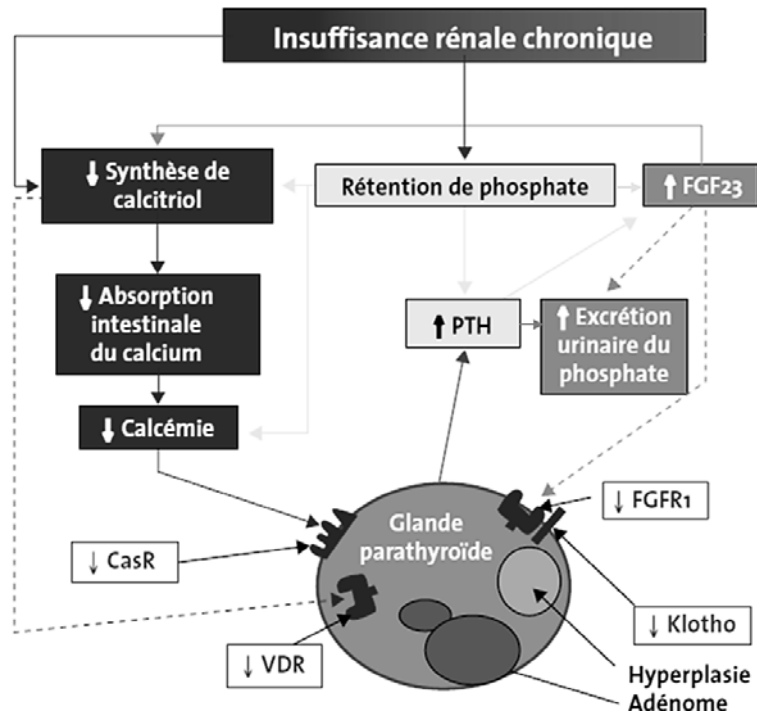


Figure 2 : Physiopathologie des troubles du métabolisme minéral associés à la Maladie Rénale Chronique. D'après (18). CaSR : récepteur sensible au calcium, FGFR1 : récepteur au FGF de type 1, VDR : récepteur à la vitamine D.

La baisse de Klotho circulant est l'évènement le plus précoce, dès le stade 2 de la MRC, et se poursuit avec la baisse du DFG (figure 3) (19). Cette diminution est à l'origine d'une résistance partielle au FGF23, qui augmente afin de maintenir une phosphatémie dans la norme. Des taux élevés de FGF23 ont également été retrouvés dans des cohortes de patients avec une altération minimale de la fonction rénale, comme les patients néphrectomisés pour don de rein (20). L'augmentation des taux de FGF23 entraîne une diminution de la vitamine D active, et une élévation de la parathormone (PTH). L'hyperphosphatémie apparaît tardivement au cours de la MRC (figure 3) (8).

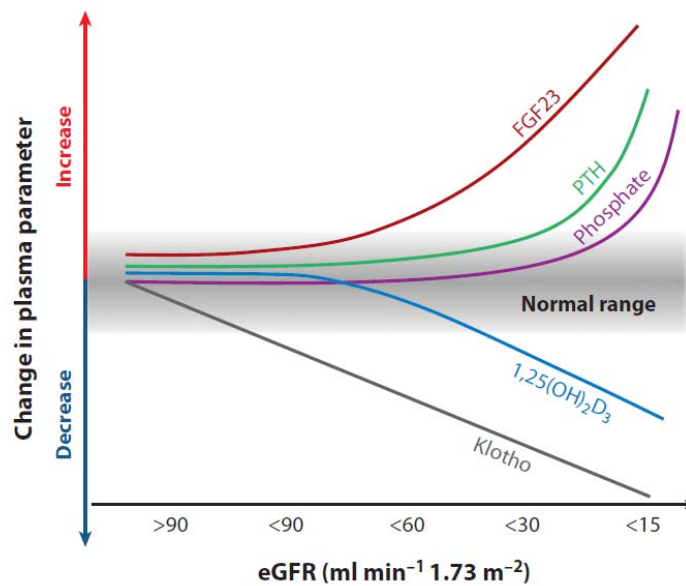


Figure 3 : Cinétique de perturbation des différents acteurs du métabolisme minéral au cours de la Maladie Rénale Chronique. La diminution des taux circulants de Klotho est un événement précoces dans le cours de l'insuffisance rénale chronique. L'hyperparathyroïdie et l'hyperphosphatémie sont observés tardivement. D'après (8). La zone grisée représente la norme ; l'échelle en ordonnée n'est pas représentative des taux réellement observés. eGFR= estimated Glomerular Filtration Rate.

La physiopathologie des TMO-MRC ne se limite pas aux seules perturbations hormonales et osseuses, mais implique également d'autres paramètres comme l'accumulation des toxines urémiques, l'acidose métabolique, la dénutrition, l'inflammation chronique ou encore la iatrogénie (14). Ainsi, l'urémie s'accompagne d'un état d'inflammation chronique, associé à une augmentation du stress oxydatif, et une résistance à l'insuline ; trois facteurs qui favorisent la survenue de calcifications vasculaires (2). Par ailleurs, l'acidose métabolique chronique de la MRC mobilise le carbonate de calcium stocké dans compartiment osseux comme tampon, et favorise la déminéralisation osseuse. Il est possible que l'état d'urémie modifie les propriétés cellulaires : des études concernant les cellules souches mésenchymateuses (MSC), qui sont les précurseurs des ostéoblastes, suggéraient une diminution de leur capacités de différenciation vers le lignage ostéoblastique : des MSC issues de rats rendus insuffisant rénaux mises en culture présentaient des signes de sénescence précoce (moindre taux de prolifération, accumulation de fibres de stress, adipogénèse spontanée). De plus, leur capacités de régénération rénale *in vivo* dans un modèle



d'insuffisance rénale aiguë étaient limitées (21). Enfin, l'âge, la perte de mobilité, sont des facteurs de risque surajoutés de perte osseuse (22).

### 3. OSTEODYSTROPHIE RENALE

#### a. CLASSIFICATION ANATOMOPATHOLOGIQUE

Le terme d'ostéodystrophie rénale est désormais réservé à la description des anomalies histologiques osseuses observées chez les patients insuffisants rénaux chroniques. Les KDIGO ont proposé une classification basée sur les mécanismes responsables de ces perturbations : il s'agit de la classification TMV, où T représente le « turnover », soit le taux de remodelage osseux, M la minéralisation, c'est-à-dire le processus de calcification du réseau collagénique, et V le volume d'os rapporté au volume tissulaire total. Ces trois paramètres sont déterminés par histomorphométrie, c'est-à-dire étude quantitative histologique, à partir d'une biopsie osseuse (7).

Un excès de remodelage osseux conduit à des lésions d'ostéite fibreuse, où le volume osseux est plutôt augmenté, sans altération de la minéralisation. Histologiquement, on observe une augmentation du nombre et de l'activité des ostéoblastes, conduisant à l'accumulation de matrice ostéoïde. De la même manière, le nombre d'ostéoclastes et l'activité de résorption osseuse sont augmentés. S'y ajoute une fibrose médullaire des espaces péri-trabéculaires. A l'inverse, un taux de remodelage bas se traduit par un tissu osseux de faible volume, dans lequel les ostéoblastes sont peu actifs, les ostéoclastes et le nombre de lacunes de résorption peu nombreuses. Il s'agit d'un tableau d'ostéopathie adynamique, fréquemment rencontré chez les sujets âgés, diabétiques, traités par dialyse péritonéale ou ayant eu un apport en calcium ou en vitamine D excessif. Il s'agit de la lésion d'ostéodystrophie rénale la plus fréquemment rencontrée dans les pays occidentaux.

L'ostéomalacie, définie par un défaut de minéralisation, est peu fréquente dans les TMO-MRC. Enfin, on définit une quatrième entité histologique, l'ostéopathie mixte urémique, proche de l'ostéite fibrosante, avec toutefois un volume ostéoïde plus marqué, associé à un trouble de la minéralisation (Tableau 2). La toxicité aluminique, autrefois observée chez les patients hémodialysés ou traités par sels d'aluminium, peut réaliser un tableau d'ostéopathie adynamique, d'ostéomalacie ou de lésions mixtes. Compte tenu de l'amélioration des techniques d'hémodialyse, et notamment la

purification des dialysats et l'utilisation de chélateurs du phosphate non aluminiques, cette entité est désormais rare (7,18,22).

	<b>Taux de remodelage osseux</b>	<b>Minéralisation primaire</b>	<b>Volume ostéoïde</b>
<b>Ostéite fibreuse</b>	↑ ou ↑↑	N ou ↑	↑ ou ↑↑↑
<b>Ostéopathie adynamique</b>	↓	N	N ou ↓
<b>Ostéomalacie</b>	N ou ↓	↓↓	↑↑↑
<b>Ostéopathie mixte</b>	↑ ou ↑↑↑	↓ ou ↓↓	↑↑↑

Tableau 2 : Description des 4 types histologiques d'ostéodystrophie rénale selon la classification TMV. D'après (14). N : normal.

En 2011, une équipe américaine a colligé 630 biopsies osseuses de patients américains et européens au stade 5 de la MRC, traités par hémodialyse (95%) ou dialyse péritonéale (5%). Parmi les patients caucasiens, le remodelage osseux était bas dans la majorité des cas (58%) normal chez 18% des patients et élevé chez 24%. Cette répartition était différente chez les patients afro-américains : le remodelage était plus fréquemment élevé (42,5%), que bas (32%). Les défauts de minéralisation étaient rares (3,5%), quel que soit l'origine ethnique, et le volume osseux plutôt élevé dans la population afro-américaine alors que la proportion de volume osseux élevé, normal ou bas parmi les caucasiens était semblable (23).

L'ostéoporose ne fait pas partie des troubles du métabolisme osseux associés à la MRC, cependant ces deux pathologies affectent préférentiellement les sujets âgés, et peuvent donc coexister chez certains patients. Par ailleurs, de récents travaux ont montré qu'une hyponatrémie modérée favorisait le développement de l'ostéoporose, or 13% des patients incidents en dialyse présentent une hyponatrémie (24).

#### b. PHYSIOPATHOLOGIE

L'hyperparathyroïdie est responsable d'une augmentation du remodelage en stimulant les pré-ostéoblastes, qui possèdent un récepteur à la PTH. Ces derniers expriment M-CSF et RANK-ligand, deux facteurs de différenciation des ostéoclastes (14). Les

lésions de myélofibrose, observées dans les tableaux de haut remodelage impliquent un trouble de différenciation ostéoblastique, où les précurseurs s'orientent préférentiellement vers un phénotype fibroblastique (25). A l'opposé, un bas niveau de remodelage est favorisé par la correction excessive d'une hyperparathyroïdie, mais peut également être observé chez des patients indemnes de tout traitement. D'autres facteurs ont été incriminés, notamment un déficit en Bone Morphogenic Protein 7 (BMP7), facteur de différenciation ostéoblastique produit par les reins ; la diminution de l'expression des récepteurs osseux à la PTH ; la formation de fragments C-terminaux de la PTH qui freineraient le remodelage osseux, et enfin l'augmentation de l'expression d'inhibiteurs de la voie Wnt, qui est nécessaire à la différenciation ostéoblastique. Parmi ces inhibiteurs : la sclérostine (SOST), Dickkopf1 et secreted Frizzled-Related Protein 4 (sFRP4).

En utilisant un modèle d'IRC progressive (souris *jck* développant des reins polykystiques), Sabbagh *et al.* ont observé une dégradation de la fonction rénale après 6 semaines de vie, puis progressivement une augmentation du FGF23 circulant et enfin de la PTH. Aux stades précoces de la MRC, la sclérostine est surexprimée par les ostéocytes, conduisant à une répression de la voie Wnt/ $\beta$ caténine, et donc une inhibition de l'ostéof ormation, comme observée dans l'ostéopathie adynamique. Plus tardivement, les taux de SOST ostéocytaires diminuent, en réponse à l'hyperparathyroïdie, alors qu'un autre antagoniste, sFRP4 est surexprimé (14,26).

Le processus de minéralisation nécessite un stock suffisant de Ca et Pi ; il est dépendant de l'activité ostéoblastique, et sera donc modifié par les inhibiteurs cités précédemment. La carence en vitamine D, l'acidose métabolique et plus rarement l'intoxication aluminique, en fer ou en strontium peuvent favoriser l'ostéomalacie (14).

De façon générale, le volume osseux dépend du taux de remodelage et d'un éventuel découplage entre ostéof ormation et résorption. L'excès de PTH, la présence d'inhibiteurs ostéoblastiques comme SOST mais également l'hypogonadisme, fréquent chez les patients IRC des deux sexes, sont responsables d'un tel découplage (14).

Les travaux actuels placent l'ostéocyte au cœur des anomalies du métabolisme osseux liées à la MRC. En effet, dès le stade 2 de la MRC, cette cellule est responsable de la sécrétion de sclérostine et du FGF23, acteurs majeurs des perturbations osseuses, biologiques et cardiovasculaires observées au cours de la MRC (27–30).

### c. OUTILS DIAGNOSTIQUES

Le diagnostic de certitude de l'ostéodystrophie rénale repose sur la biopsie osseuse. Elle permet de préciser le type d'atteinte histologique et de guider la prise en charge thérapeutique (7). Il s'agit cependant d'un geste invasif, coûteux, et qui n'est pas disponible dans tous les centres. La biopsie osseuse doit donc être réservée à quelques situations clinico-biologiques particulières, graves ou requérant un traitement spécifique: fractures inexplicées, douleurs osseuses persistantes, calcifications vasculaires sévères, hypercalcémie ou hypophosphatémie inexplicée, suspicion de toxicité aluminique ; avant une parathyroïdectomie, si le tableau d'hyperparathyroïdie secondaire ou tertiaire n'est pas formel, et éventuellement avant la prescription d'un traitement par biphosphonates chez un patient atteint de TMO-MRC (7).

Une analyse histomorphométrique doit être réalisée, et les résultats formulés selon la classification TMV. Cette technique permet de quantifier différentes structures, mais également de déterminer la vitesse du remodelage ou de la minéralisation grâce à la technique du double marquage par la tétracycline. La tétracycline est administrée au patient par voie orale à 15 jours d'intervalle. Cette molécule se fixe sur les fronts de minéralisation, visible en microscopie sous la forme d'un liseré jaune, et permet ainsi de quantifier le taux de formation osseuse, ou la vitesse de minéralisation (7).

En pratique clinique quotidienne, il serait souhaitable de disposer d'autres outils d'évaluation de l'architecture osseuse, moins invasifs, et pouvant fournir des informations à différents sites du squelette et à permettre un suivi des anomalies observées dans le temps (31). Les dosages plasmatiques de la PTH sérique et des phosphatases alcalines osseuses sont des marqueurs du remodelage osseux utiles et accessibles en routine. D'autres marqueurs du remodelage (ostéo-formation et résorption) sont disponibles ; leur dosage dans le contexte de MRC n'est pas recommandé, du fait de leur interprétation délicate, certains étant épurés par voie rénale (ostéocalcine, propeptide N-terminal du procollagène de type I, télopeptide

« crosslinked » du collagène de type I). Cependant il semble qu'utilisés de manière combinée avec ou sans dosage de PTH, ces marqueurs puissent être prédictifs du taux de remodelage, mais également de la perte osseuse et du risque fracturaire chez l'insuffisant rénal chronique et le patient transplanté rénal (31,32).

L'absorptiométrie biphotonique à rayons X (DXA) est une technique largement utilisée dans la population générale pour le diagnostic d'ostéoporose. Elle ne permet pas d'évaluer le remodelage ni la minéralisation osseuse, mais quantifie le volume osseux et précise l'architecture osseuse. Sa résolution ne permet pas de discriminer l'os cortical de l'os spongieux, et la présence de calcifications vasculaires peut en fausser les mesures, notamment au niveau rachidien. L'utilisation de la DXA n'est pas recommandée chez les patients atteints de MRC (32). Cependant, en 2012, deux études prospectives ont montré une corrélation entre la densité minérale osseuse (DMO) mesurée par DXA au niveau de la hanche et du col fémoral et le risque fracturaire chez des patients insuffisant rénaux (31).

#### 4. CALCIFICATIONS VASCULAIRES

On distingue deux types de calcifications vasculaires, qui diffèrent selon leur topographie et leur pathogénie :

- les calcifications intimes sont associées aux lésions athéromateuses. Elles sont préférentiellement observées chez les patients âgés, présentant des facteurs de risque cardiovasculaire conventionnels ou bien ayant des antécédents d'évènements cardiovasculaires. Les plaques athéromateuses intimes calcifiées correspondent à des lésions évoluées, souvent associées à des évènements thrombo-occlusifs.
- Les calcifications médiales, sont responsables d'un épaissement pariétal, et sont retrouvés chez les patients insuffisants rénaux chroniques (33).

Ces deux types de calcifications coexistent fréquemment chez les patients insuffisants rénaux chroniques, qui peuvent cumuler les facteurs de risque cardiovasculaires que sont l'hypertension artérielle, le diabète, et/ou un âge avancé.

Le développement des calcifications dans le cadre des TMO-MRC est un processus actif, qui implique plusieurs mécanismes :

- des perturbations du métabolisme minéral conduisant à une hyperphosphatémie et à l'augmentation du produit phosphocalcique ;
- la perte d'inhibiteurs circulants ou locaux (c'est-à-dire vasculaires) de la minéralisation, événement qui favorise la différenciation des cellules musculaires lisses vasculaires (VSMC) et des péricytes en cellules capables de minéraliser leur matrice.
- Et enfin, une dysfonction endothéliale, favorisée par l'inflammation chronique et les dérivés actifs de l'oxygène (34).

Parmi les inhibiteurs de la minéralisation, la Fetuin-A est une protéine hépatique dont l'expression diminue en période inflammatoire. Elle capte le Ca et le Pi circulant pour former des « calciparticules » qui seront épurées par le système réticulo-endothélial (34). La MRC favorise l'inflammation chronique et la donc l'inhibition de la Fetuin-A. En conséquence, Ca et Pi circulent librement, et sont disponibles pour la création de calcifications. L'excès de FGF23, et la diminution de l'expression de Klotho comme observés au cours de l'insuffisance rénale chronique favorisent également le développement de calcifications vasculaires (16,35).

L'hyperphosphatémie, la Bone Morphogenic Protein 2 (BMP2) stimulent l'expression de gènes de différenciation ostéoblastique par les VSMC, à travers l'expression ou l'inhibition de microARNs. Ces cellules vasculaires vont ainsi adopter un phénotype ostéoblastique, capter les minéraux circulants, et permettre leur dépôt dans la paroi vasculaire.

Parmi les inhibiteurs locaux de la minéralisation, on peut citer le pyrophosphate, l'ostéopontine et la matrice-gla protéine (MGP). La MGP est une protéine sécrétée par les chondrocytes et les VSMC, qui inhibe la précipitation du calcium et la formation de cristaux de phosphate de calcium. Son action nécessite un gamma-carboxylation dépendante de la vitamine K (35). Au cours de la MRC, des niveaux élevés de MGP non carboxylée ont été observés, en lien avec une carence d'apport en vitamine K. Un essai randomisé prospectif, actuellement en cours, étudie l'effet d'une supplémentation en vitamine K1 sur la progression des calcifications aortiques et coronariennes dans une population d'adultes hémodialysés (36). Les antagonistes de la vitamine K (AVK) affectent également le métabolisme vasculaire : plusieurs études

observationnelles concernant la population générale ou hémodialysée montrent une association entre la prise d'AVK et la progression de calcifications coronariennes et valvulaires (37).

De nombreuses études pré-cliniques et cliniques soulignent l'existence d'un lien entre le métabolisme osseux et la formation de calcifications vasculaires. Cependant il n'est pas démontré qu'il s'agisse d'un lien de causalité direct, ou bien d'un mécanisme physiopathologique commun. Ainsi, dans une étude portant sur 64 patients hémodialysés, Barreto *et al.* ont mis en évidence une association significative entre une diminution du volume osseux trabéculaire et la progression de calcifications coronariennes. De plus, l'amélioration du remodelage sur la biopsie réalisée un an plus tard, quel que soit le niveau de remodelage initial, était associée à une moindre progression des calcifications vasculaires (38). De la même manière, parmi des patients suivis pour une ostéoporose et avec une fonction rénale conservée, la prise d'un traitement anti-ostéoporotique, donc ralentissant le remodelage osseux, était associée à une diminution de la progression de calcifications valvulaires aortiques (39).

La sclérostine (SOST) fait partie des inhibiteurs de la voie Wnt, qui bloquent la différenciation ostéoblastique (II.A.3.b). Elle semble également être impliquée dans le processus de calcification vasculaire. En effet, SOST est retrouvée au niveau des calcifications cardiovasculaires des patients atteints de MRC. Les données concernant une éventuelle relation entre la sclérostine sérique et l'existence de calcifications vasculaires sont contradictoires, et biaisées par l'absence de standardisation des techniques de mesure. Malgré tout, SOST circulante augmente avec le stade de la MRC, et la présence de marqueurs inflammatoire. Par ailleurs, une étude récente a montré l'existence d'une association entre l'excès de SOST circulant et la diminution de l'épaisseur corticale du tibia, dans une cohorte de patients hémodialysés (40–42). La voie Wnt est impliquée dans la genèse des lésions vasculaires : des familles porteuses d'une mutation d'un corécepteur conduisant à l'inhibition de la transduction du signal Wnt développent des lésions coronariennes précoces, en association avec une ostéoporose. Le rôle de SOST dans la genèse des calcifications n'est pas clairement identifié ; est-il le reflet de la trans-différenciation terminale des VSMC en cellules ostéocytaires ou bien un agent protecteur (40) ?

## B. EXPRESSION CLINIQUE ET PRISE EN CHARGE THERAPEUTIQUE

### 1. MORBIDITE ET MORTALITE LIEE AUX TMO-MRC

Les troubles du métabolisme osseux associés à la maladie rénale chronique sont à l'origine d'une morbidité et une mortalité conséquente. En touchant à la fois l'os cortical et spongieux, ils sont à l'origine de perturbations des fonctions mécaniques et métaboliques du tissu osseux.

En ce qui concerne les propriétés mécaniques de l'os, on observe chez les patients insuffisants rénaux une augmentation de l'incidence de fractures, douleurs osseuses, et troubles de la croissance chez l'enfant (35,43,44). Dans une série de patients américains de sexe masculin atteints d'une MRC de stade 3, le risque relatif de fracture de hanche était estimé à 1,28 (intervalle de confiance à 95% : 0,88-1,66) et à 3,98 pour une MRC de stade 4 (intervalle de confiance à 95% : 2,25-7,74) (43). Ces fractures sont à l'origine d'un plus grand nombre d'hospitalisations et de décès dans cette population (44,45). L'origine des fractures observées chez les patients insuffisants rénaux sont pour la plupart multifactorielles, et ne peuvent être expliquées seulement par les modifications du tissu osseux liées aux TMO-MRC. Les patients atteints d'IRC sont pour la plupart âgés, et peuvent être atteints d'ostéoporose (24). Par ailleurs, la polymédication, mais également l'inactivité physique, les troubles de la nutrition, la faiblesse musculaire et la neuropathie périphérique qui accompagnent la progression de la MRC, augmentent le risque de chute (figure 4) (46,47).



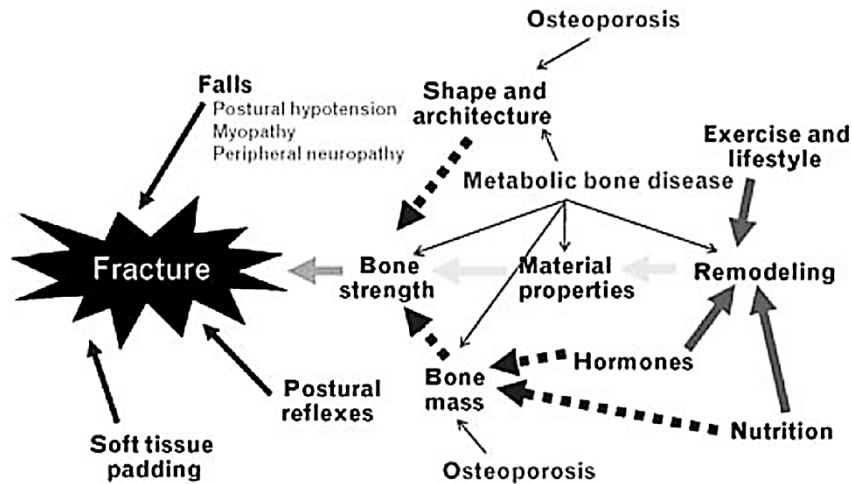


Figure 4 : Etiologies des fractures chez les patients atteints de Maladie Rénale Chronique. Au-delà des altérations qualitatives et quantitatives de l'architecture osseuse, les patients insuffisants rénaux chroniques ont un risque fracturaire plus important lié à un risque de chute accru, d'origine multifactorielle : sarcopénie, troubles de l'équilibre, neuropathie périphérique, inactivité. D'après (47).

Les perturbations du métabolisme minéral liées à la MRC sont associées à une augmentation du risque de décès, comme décrit par de nombreuses études de cohorte (44,45,48,49). En 2004, une large étude portant sur des patients hémodialysés américains observait une association entre phosphatémie et mortalité pour un taux supérieur à 5 mg/dl, après ajustement pour plusieurs variables confondantes (Risque Relatif (RR)=1,10 ; intervalle de confiance à 95% 1,02-1,17). Ce risque augmente de façon majeure pour des taux de phosphatémie supérieurs (pour une phosphatémie à 11mg/dL : RR= 2.47 ; intervalle de confiance à 95% 1.90-3.19). Les autres perturbations du métabolisme minéral (augmentation du produit phosphocalcique ou de la calcémie, parathormone supérieure à 600 pg/ml) étaient également associées à une surmortalité (49,50). De la même manière, le FGF-23 est retrouvé comme facteur de risque de mortalité dans une cohorte de patients incidents en hémodialyse, de manière indépendante de la phosphatémie ou des autres variables confondantes (51). Cependant, dans un modèle préclinique, un régime pauvre en phosphate donné à des souris invalidées pour le gène du FGF23 permettait de corriger l'hyperphosphatémie, les calcifications vasculaires, et la surmortalité observés sous un régime normal, traduisant le poids de la phosphatémie sur la morbidité-mortalité (52).

Les conséquences cardiovasculaires des TMO MRC sont multiples : l'augmentation du FGF-23 chez les patients insuffisants rénaux chroniques est associée à une hypertrophie ventriculaire gauche (53) ; l'hyperphosphatémie est associée à une surmortalité cardiovasculaire, d'étiologie variable (mort subite, coronaropathie, atteinte vasculaire cérébrale) (50). Dans l'étude de London en 2003, les calcifications vasculaires en position médiale, associées aux TMO-MRC, étaient associées à une surmortalité cardiovasculaire, toutefois inférieure aux calcifications intimes athéromateuses (33).

## 2. PRISE EN CHARGE THERAPEUTIQUE DES TMO-MRC

### a. ETAT DES CONNAISSANCES ET RECOMMANDATIONS DE BONNE PRATIQUE

La prise en charge des perturbations du métabolisme minéral et osseux liés à l'insuffisance rénale chronique implique de définir des cibles thérapeutiques. Cependant, observer le bénéfice d'une intervention thérapeutique sur des critères forts comme la survenue d'évènements cardiovasculaires, le risque fracturaire ou même la mortalité impliquerait des études sur de longues périodes, difficilement concevables. Ainsi, le niveau de preuve est fondé en grande partie sur des études observationnelles. L'étude COSMOS, issue d'une cohorte prospective et multicentrique de patients hémodialysés suivis sur trois ans, rapporte une amélioration de la survie chez les patients qui amélioraient une hyperphosphatémie, une hypercalcémie, ou qui augmentaient leur PTH, initialement basse (54).

Les recommandations de bonne pratique internationales (KDIGO) retiennent comme cibles thérapeutiques :

- La phosphatémie, qui doit être maintenue dans les valeurs normales aux stades 3 à 5 de la MRC. Au stade 5 dialysé (5D) des phosphatémies élevées doivent être ramenées vers les valeurs normales.
- La calcémie, qui doit être maintenue dans les valeurs normales.
- La PTH, qui, si elle est élevée aux stades 3 à 5 de la MRC doit faire rechercher et corriger une hyperphosphatémie, une hypocalcémie ou un déficit en vitamine D native. Dans le cas où persisterait une hyperparathyroïdie malgré la correction de ces facteurs modifiables, un traitement par calcitriol ou analogue de la vitamine D (VDRA) est suggéré par les KDIGO. Au stade 5D, la PTH

doit être maintenue entre deux et neuf fois la limite supérieure du laboratoire. Les calcimimétiques peuvent être utilisés en association ou remplacement de la vitamine D activée. Des variations importantes ou rapides du dosage de PTH doivent entraîner une intervention thérapeutique afin de la maintenir dans cet intervalle.

- La croissance staturale chez les enfants aux stades 2 à 5D (32).

Alors que certains considèrent que les calcifications vasculaires sont un critère intermédiaire, reflet de l'inflammation systémique secondaire aux facteurs de risque cardiovasculaires (55), d'autres pensent qu'elles sont le reflet d'un risque cardiovasculaire cumulé, et qu'il s'agit d'un phénomène modifiable qui doit être dépisté pour adapter la prise en charge de manière individuelle (56). Les KDIGO recommandent que la présence de calcifications vasculaires ou d'anomalies histomorphométriques sur la biopsie osseuse soient prises en compte dans le choix des molécules utilisées.

La prise en charge d'une hyperphosphatémie débute par la restriction des apports alimentaires en phosphate, de 800 à 1000 mg/jour (57). Il faut encourager la réduction des apports en conservateurs, riches en phosphates, et favoriser les aliments ayant un ratio phosphate/protéines faible (58). L'étape suivante consiste à prescrire un chélateur du phosphate : on distingue les chélateurs calciques (carbonate et acétate de calcium), des non-calciques (à base de magnésium, sevelamer ou lanthanum). Leurs avantages, inconvénients et effets sont résumés dans le Tableau 3. Les chélateurs aluminiques sont désormais abandonnés, compte tenu de leur toxicité neurologique et osseuse. Un chélateur ferrique (citrate ferrique) a récemment été testé dans un essai randomisé intéressant une population d'insuffisants rénaux aux stades 3 à 5 présentant une carence martiale et une phosphatémie supérieure ou égale à 4- 6 mg/dl. L'utilisation de cette nouvelle molécule pendant 12 mois a permis de réduire la phosphatémie, les taux de FGF23, d'améliorer la carence martiale et l'hémoglobinémie en comparaison avec les sujets contrôles (59).

En cas d'hypocalcémie associée à une hyperphosphatémie, un chélateur calcique doit être préféré. Lorsque la calcémie est normale ou basse, les différents types de chélateurs sont envisageables. Cependant il a été rapporté une association entre

l'utilisation de chélateurs calciques du phosphate et la progression de calcifications vasculaires (60–62). Les recommandations internationales suggèrent de limiter les doses de chélateurs calciques chez les patients atteints de calcifications vasculaires. Malgré tout, différentes études comparant le sevelamer aux chélateurs calciques sur le critère dur de mortalité ont montré des résultats divergents, ne permettant pas de conclure sur un réel bénéfice clinique d'une classe par rapport à l'autre (55,63,64).

L'utilisation de calcitriol ou d'analogues de la vitamine D permet de lutter contre l'hyperparathyroïdie et l'accélération du remodelage osseux. Il est cependant souhaitable d'utiliser de faibles doses de vitamine D active, afin d'éviter toute hypercalcémie ou hyperphosphatémie qui favoriserait les calcifications ectopiques. Les activateurs du récepteur de la vitamine D (VDRA) ont été développés dans le but de limiter la sécrétion de PTH sans augmenter la calcémie. Les études cliniques réalisées n'ont pas permis de vérifier cette hypothèse. Plusieurs études rétrospectives américaines et japonaises suggéraient un avantage en terme de taux d'hospitalisation, de mortalité cardiovasculaire ou globale sous VDRA (65). Dans l'essai prospectif randomisé PRIMO, le paricalcitol ne permettait pas d'amélioration de la masse ventriculaire gauche, et était associé à des épisodes d'hypercalcémie, et une dégradation de la fonction rénale (66).

Chélateur	Nombre de cp /jour	Avantages	Inconvénients	Effet sur la mortalité	Effet sur les calcifications vasculaires	Effets sur Ca, Pi	Coût annuel (USD)
Calcium carbonate	3-6	Efficace, peu coûteux	Possible ↑Ca, ↑calcifications	NC	NC	↓Pi 0.9 mg/dl ↑Ca 0.5 mg/dl en moyenne	100-200
Calcium acétate	6-12	Efficace, peu coûteux	Possible ↑Ca, ↑calcifications	NC	NC	↓Pi > Ca carbonate	1000-2000
Magnésium hydroxide	1-6	Efficace, peu coûteux	Possible dépression respiratoire Diarrhée	NC	NC	↓Pi ≈ chélateurs calciques	120
Magnésium carbonate	2-6	Efficace, peu coûteux	Possible dépression respiratoire Diarrhée	NC	NC	↓Pi ≈ chélateurs calciques	120
Sevelamer hydrochloride (HCl)	6-12	Efficace, pas de calcium, ↓LDLc	Tolérance digestive Risque d'acidose métabolique Coût	Pas de différence vs. chélateurs calciques	Tendance ↓ progression vs. chélateurs calciques		4400-8800
Sevelamer carbonate	6-12	Identique au Sevelamer HCl, avec un moindre risque d'acidose métabolique	Tolérance digestive Coût	Probablement identique au Sevelamer HCl	Probablement identique au Sevelamer HCl		5500-11000
Lanthanum carbonate	3-6	Efficace, pas de calcium, ↓	Possible accumulation tissulaire, Coût	NC	NC		7000-14000

Tableau 3 : Effets des chélateurs du phosphate sur la mortalité, les calcifications vasculaires et le métabolisme minéral. Issu de (67). Ca : calcium, HCl : hydrochloride, LDLc : low density lipoprotein cholesterol, NC : non connu, Pi : phosphate, USD : dollars américains.

Au stade 5D de la MRC, le cinacalcet, traitement calcimimétique inhibiteur de la sécrétion de parathormone, est une alternative thérapeutique puissante à la vitamine D active. L'essai prospectif randomisé ADVANCE a montré une réduction de la progression des scores de calcifications cardiovasculaires sous l'effet du cinacalcet en association avec de faibles doses de calcitriol dans une population hémodialysée (68). Cependant, son évaluation sur des critères cliniques de mortalité et morbidité cardiovasculaire dans l'essai EVOLVE n'a pas permis de mettre en évidence d'avantage en faveur du calcitriol (69). Enfin, une parathyroïdectomie peut être proposée aux patients ayant une hyperparathyroïdie non contrôlée (PTH>1000pg/ml) (58).

En ce qui concerne la prise en charge spécifique des lésions osseuses, l'utilisation des biphosphonates est interdite aux stades 4 et 5 de la MRC, compte tenu du risque d'accumulation. Une étude pilote réalisée sur 50 patients au stade 3-4 de la MRC comparait l'alendronate à un placebo sur l'évolution des calcifications vasculaires en imagerie. Aucune différence n'a pu être observée sur ce critère ; cependant les patients présentaient une amélioration de la densité minérale osseuse au site lombaire (70). Par ailleurs, l'étude rétrospective d'une cohorte de patientes américaines traitées par biphosphonates et présentant une altération de la fonction rénale (en moyenne 51,8 ml/min/1.73m<sup>2</sup>) n'a pas permis de mettre en évidence une réduction du risque cardiovasculaire en comparaison avec un groupe contrôle. La mortalité globale était cependant diminuée de 22% dans le groupe traité, après ajustement pour les variables confondantes (71).

Le Denosumab est un anticorps monoclonal anti-RANK-ligand, qui bloque la différenciation et l'action des ostéoclastes. Utilisé en deuxième ligne dans l'ostéoporose post-ménopausique, il a montré une amélioration de la DMO et du risque fracturaire. Sa pharmacocinétique n'est pas modifiée par différents niveaux d'altération de la fonction rénale, rendant envisageable son utilisation dans les TMO-MRC (72). Une équipe taiwanaise a étudié l'association Denosumab et calcitriol sur une population d'adultes hémodialysés ayant une hyperparathyroïdie non contrôlée (PTH >800 pg/mL) et une densité minérale basse. En comparaison avec un groupe contrôle, les auteurs observaient chez les patients traités une amélioration de la densité minérale osseuse, de l'hyperparathyroïdie et du volume de leurs glandes parathyroïdiennes mesurées par échographie ultra-sensible (73).

Enfin, un anticorps monoclonal anti-sclérostine est en cours d'évaluation dans un essai de phase III.

b. EVOLUTION ET PRISE EN CHARGE DES TROUBLES DU METABOLISME OSSEUX APRES TRANSPLANTATION RENALE

Après transplantation rénale, l'évolution du métabolisme osseux dépend de trois facteurs : la préexistence d'une ostéodystrophie rénale avant la greffe et ses caractéristiques en terme de turnover, volume et minéralisation ; le régime d'immunosuppresseur auquel le patient est soumis ; et enfin l'existence d'une altération persistante de la fonction du greffon (figure 5) (74,75). Classiquement, les taux de PTH circulants diminuent rapidement : de plus de 50% dans les 3 à 6 mois post-greffe, correspondant à une involution du tissu parathyroïdien. Cependant, dans plus d'un quart des cas, on observe la persistance d'une hyperparathyroïdie après transplantation, alors même que la fonction rénale est normalisée (74).

Parmi les traitements anti-rejet, les corticostéroïdes semblent avoir l'effet le plus délétère sur le tissu osseux. D'une part en diminuant l'absorption digestive de calcium et favorisant son excrétion urinaire, ce qui favorise l'hypocalcémie et donc l'hyperparathyroïdie secondaire ; d'autre part en découplant la formation et la résorption osseuse, conduisant à une perte osseuse. En effet, les corticoïdes inhibent la différenciation et l'action des ostéoblastes, favorisent leur apoptose, et stimulent la différenciation des ostéoclastes via l'augmentation du RANK-ligand et la diminution d'ostéoprotégérine, récepteur leurre du RANK-ligand. Ils sont également pourvoyeurs d'hypogonadisme, favorisant encore la perte osseuse (74). Les anti-calcineurines ont également été associés à une perte osseuse dans des études précliniques, via une stimulation de l'ostéoclastogénèse. En pratique clinique, il n'a pas été démontré d'augmentation du risque de fractures chez les patients traités par anti-calcineurines. Les inhibiteurs de mTOR exercent un effet antiprolifératif sur les cellules osseuses ; une étude menée chez le rat ovariectomisé traité par everolimus a montré une diminution de la perte osseuse trabéculaire (76). Enfin, les traitements comme l'azathioprine, le mycofenolate mofétil et les traitements d'inductions ont un effet bénéfique sur le métabolisme osseux en permettant de limiter l'exposition aux corticoïdes (74).

Les études histomorphométriques portant sur les patients greffés montrent ainsi des résultats hétérogènes ; le phénotype osseux le plus fréquemment rencontré associe un turnover bas à un volume osseux diminué. La minéralisation est, elle, normale ou faible. Le risque fracturaire est majeur dans cette population, et décroît avec le temps. Il est estimé supérieur de 360 à 380% par rapport à la population générale, et supérieur de 30% aux patients hémodialysés pendant les trois premières années de greffe. Les fractures rachidiennes sont les plus fréquentes, probablement en lien avec une plus grande proportion d'os spongieux au niveau vertébral, qui est le tissu le plus sensible aux corticoïdes (74,77).

La DMO mesurée par absorptiométrie biphotonique à rayons X (DXA) est corrélée aux taux de fractures dans la population générale, et également, mais de manière moins franche, chez les transplantés rénaux. Les KDIGO suggèrent de mesurer la DMO chez les patients greffés ayant des facteurs de risque d'ostéoporose ou traités par des corticoïdes. Il faut toutefois noter que les corticoïdes peuvent induire des fractures avant même une diminution de la DMO (77,78).

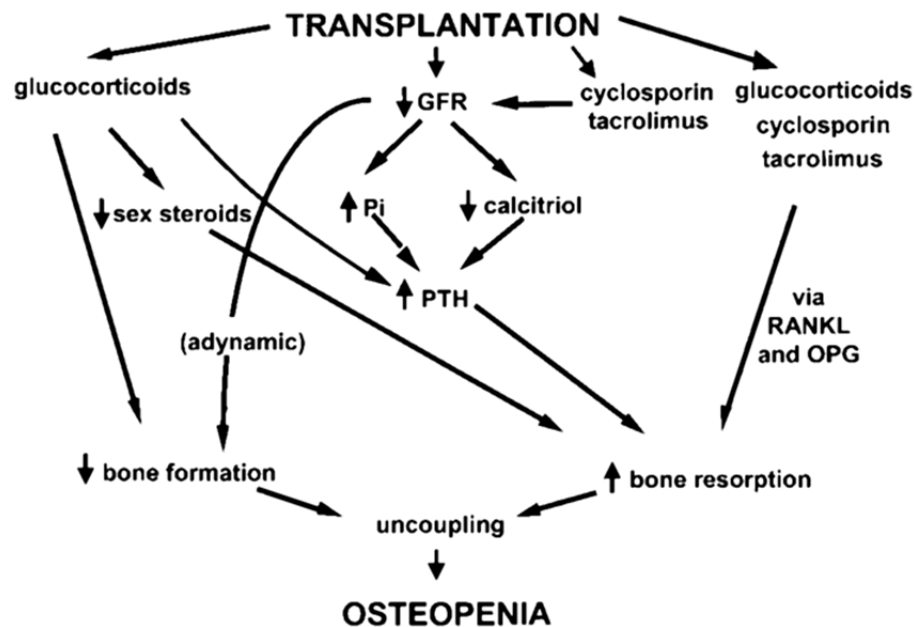


Figure 5 : Facteurs influençant le métabolisme osseux en post transplantation rénale. Issue de (75). L'altération de la fonction du greffon et l'exposition aux traitements immunosuppresseurs conduisent à un découplage entre ostéoformation et résorption suivie d'une perte osseuse. RANKL : RANK-ligand, nécessaire à la différenciation des ostéoclastes ; OPG : ostéoprotégérine, récepteur soluble du RANKL.



La prise en charge des TMO-MRC après la greffe se base tout d'abord sur des mesures générales comme l'arrêt du tabac, la diminution de la consommation d'alcool, une activité physique régulière, la gestion des facteurs de risque de chute. En l'absence de contre-indications, une supplémentation hormonale aux femmes ménopausées peut être envisagée, en gardant à l'esprit le risque thromboembolique, néoplasique et de coronaropathie. Les stratégies d'épargne et d'arrêt des corticoïdes ont prouvé une baisse de la perte osseuse mesurée par DXA ; cependant les études observationnelles s'intéressant au risque fracturaire montrent des résultats contradictoires, probablement en rapport avec l'hétérogénéité des protocoles d'épargne cortisonique (79).

Les recommandations internationales suggèrent de corriger une hypocalcémie, une carence en vitamine D native ou en calcitriol (78). L'apport de vitamine D active ou d'analogues (VDRA) sont associés à une diminution de l'hyperparathyroïdie et une amélioration de la densité minérale osseuse chez les patients transplantés. L'hypophosphatémie, fréquente après la greffe, est potentiellement délétère sur le métabolisme osseux car elle inhibe la prolifération et l'action des ostéoblastes et favorise leur apoptose. La supplémentation en phosphate doit être prudente (79).

De nombreuses études ont montré une amélioration de la DMO au rachis lombaire et au col fémoral sous biphosphonates dans la première année post transplantation rénale. Cependant, aucune n'a démontré d'amélioration du risque fracturaire. Il faut noter que ces études intéressaient de faibles effectifs de patients ; et que l'absence d'ostéopathie adynamique avant l'intervention thérapeutique n'était pas toujours vérifiée. Une méta-analyse de 11 essais cliniques rassemblant 780 patient greffés dont 42% de transplantés rénaux qui avaient été traités par biphosphonates ou VDRA dans la première année de greffe présentaient moins de fractures que les patients contrôles (77,79).

Le cinacalcet a montré une amélioration de l'hypocalcémie et l'hyperparathyroïdie post transplantation rénale dans plusieurs études de faible niveau de preuve. Cependant il n'existe pas de données objectives sur la durée optimale de traitement en cas d'hyperparathyroïdie résiduelle (79).

La PTH recombinante (teriparatide) a montré son efficacité dans la prévention du risque fracturaire chez les femmes ménopausées traitées par glucocorticoïdes. Dans la

population des transplantés rénaux, ce traitement a été insuffisamment étudié ; dans de petites séries, il semble présenter un bon profil de tolérance, mais sans preuve d'amélioration du risque fracturaire. Il semble intéressant chez les patients parathyroïdectomisés présentant une hypocalcémie franche après transplantation (79).

Enfin, le Denosumab, cet anticorps monoclonal qui ciblant le RANK-ligand, inhibiteur de l'ostéoclastogénèse n'a pas encore été évalué après greffe rénale. Il s'agit cependant d'une piste thérapeutique intéressante, comme alternative aux biphosphonates (79).

Le Tableau 4 résume les mécanismes d'actions des différentes thérapeutiques envisageables après transplantation rénale.

Traitement	Mécanisme d'action	Effet sur la PTH	Effet sur la DMO
<b>Epargne / arrêt des corticoïdes</b>	↑ formation osseuse ↑ absorption Ca <sup>2+</sup> Amélioration métabolisme vitamine D	0 ou ↓	Moindre ↓
<b>Vitamine D</b>	Apport alimentaire en vitamine D ↑ absorption Ca <sup>2+</sup>	↓	+/- Moindre ↓
<b>Calcitriol et VDRA</b>	↑ synthèse de PTH et ↑ absorption Ca <sup>2+</sup>	↓	Moindre ↓
<b>Supplémentation en phosphate</b>	↑ phosphatémie	Indéterminé	0
<b>Biphosphonates</b>	Inhibe résorption osseuse par les ostéoclastes	Possible ↑	Moindre ↓ +/- ↑
<b>Calcitonine</b>	Inhibe résorption osseuse par les ostéoclastes	0	Moindre ↓ (os trabéculaire)
<b>Calcimimétiques</b>	↑ sensibilité du CaSR au Ca <sup>2+</sup>	↓	Moindre ↓
<b>Teriparatide</b>	PTH recombinante	Indéterminé	+/- ↑ (os cortical)
<b>Denosumab</b>	Anticorps monoclonal humanisé bloquant RANK-ligand	↑	Moindre ↓ +/- ↑
<b>Parathyroïdectomie</b>	Exérèse chirurgicale des parathyroïdes	↓	Moindre ↓

Tableau 4 : Synthèse des thérapeutiques disponibles pour les TMO-MRC post-transplantation, effets sur la parathormone et la densité minérale osseuse. Issu de (79).  
*PTH : parathormone ; DMO : densité minérale osseuse ; VDRA : activateurs du récepteur à la vitamine D ou analogues de la vitamine D active ; CaSR : récepteur sensible au calcium.*

## C. MODELES EXPERIMENTAUX

### a. MODELE MURIN APOE-/-

Plusieurs modèles animaux de troubles du métabolisme minéral et osseux liés à la maladie rénale chronique ont été développés, dans l'objectif de préciser la cinétique de ces perturbations, les différents acteurs impliqués, mais également de tester de nouvelles thérapeutiques. Parmi ces modèles, nous avons choisi de nous intéresser particulièrement au modèle de souris invalidées pour le gène de l'apolipoprotéine E (ApoE-/-), combiné à un modèle chirurgical d'insuffisance rénale chronique par cautérisation corticale et néphrectomie controlatérale, qui permet d'obtenir des niveaux de MRC variables en fonction du niveau de nécrose corticale, et surtout stables dans le temps (80,81).

L'apolipoprotéine E est synthétisée par le foie, le cerveau mais également par les monocytes et macrophages. Elle est présente dans les chylomicrons et les Very Low-Density Lipoproteins (VLDL), et permet leur clairance hépatique. Les souris invalidées pour le gène de l'Apolipoprotéine E excrètent moins de cholestérol que des souris sauvages en réponse à une charge alimentaire lipidique, conduisant à une hypercholestérolémie (82). Ce modèle a été largement utilisé pour étudier l'athérosclérose : alors que les souris sont des animaux naturellement résistants à ce processus, les souris ApoE-/- développent sous régime standard des lésions athérosclérotiques qui peuvent devenir sévères et étendues lorsque l'alimentation est enrichie en lipides (83).

En condition d'insuffisance rénale chronique, on observe chez les souris ApoE-/- la présence de plaques athéromateuses au niveau de l'aorte thoracique dès 6 semaines d'urémie. Ces plaques présentent des calcifications vasculaires intimes et médiales (81). Néanmoins, la composition du régime alimentaire en Ca, Pi, protides, lipides et hydrates de carbone joue un rôle important dans le développement de ces calcifications, comme illustré par la variabilité des résultats obtenus par différentes équipes utilisant des régimes alimentaires différents (81,84,85). L'étude du phénotype osseux de ces souris a également montré des similitudes avec les TMO-MRC : le volume osseux cortical et trabéculaire est augmenté chez les souris ApoE-/- urémiques, en rapport avec une augmentation du remodelage ; la minéralisation est

altérée (86). Ces études ont pu mettre en évidence des liens entre le métabolisme osseux et la survenue de calcifications vasculaires dans ce modèle, comme la présence d'une corrélation positive entre la surface occupée par les ostéoclastes, reflet de la résorption osseuse, et les lésions d'athérome calcifié aortique (86).

Il est à noter qu'une étude souligne la possibilité d'une interaction entre la présence de lipides oxydés et l'efficacité de la parathormone *in vivo*. En traitant par injections de PTH des souris sauvages ou invalidées pour le gène du LDL-récepteur (un autre modèle d'hypercholestérolémie avec athérosclérose), les auteurs ont observé une différence en termes de minéralisation osseuse au niveau de la corticale des os longs. Cette différence était également retrouvée chez les souris ApoE<sup>-/-</sup>. Les souris hyperlipidémiques augmenteraient ainsi de manière moins marquée leur densité minérale osseuse en réponse à un traitement par PTH (87).

#### b. LA REPARATION OSSEUSE

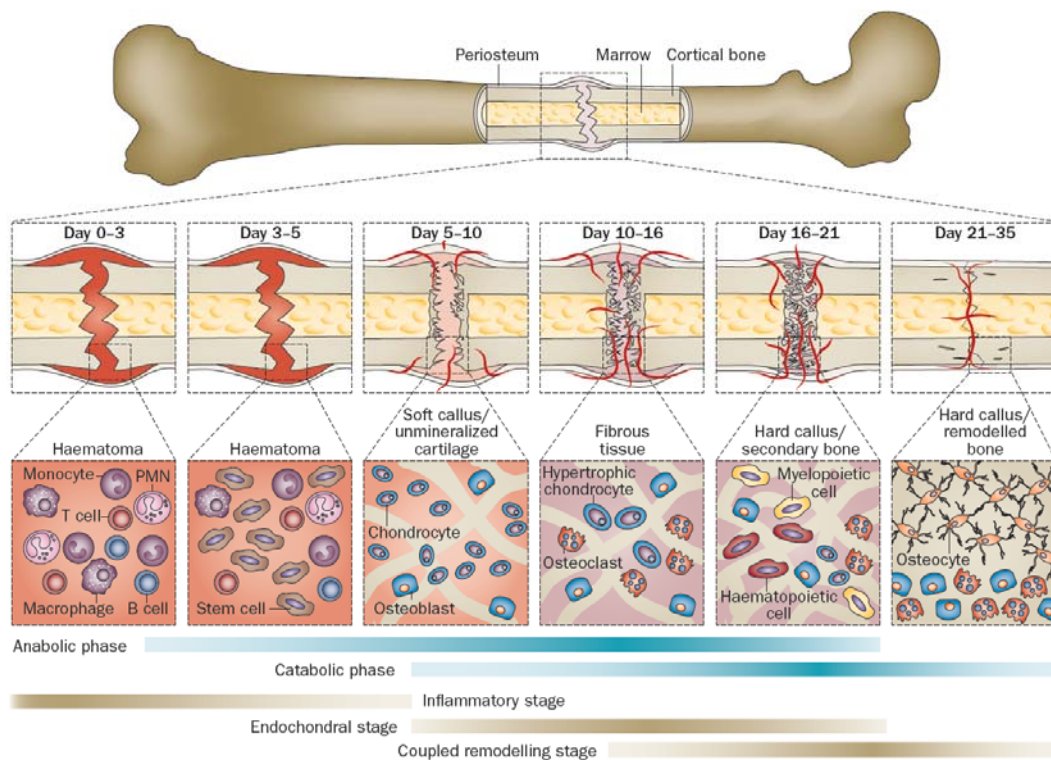
Le processus de réparation d'une fracture se déroule selon une séquence d'évènements cellulaires et moléculaires, décrits par la figure 6. Schématiquement, on décrit une phase d'hémostase et de réaction inflammatoire, conduisant à la mise en place d'un tissu de granulation qui servira de support à la formation d'un cal. Les plaquettes et les cellules inflammatoires sécrètent différentes molécules chimiotactiques, permettant de recruter au foyer de fracture les cellules immunitaires, les cellules souches, et des structures vasculaires permettant de promouvoir l'angiogénèse. Le cal cartilagineux sera progressivement résorbé, laissant place à un os primaire, formé de fibres de collagène désorganisées et d'une matrice minéralisée (ossification et minéralisation primaire). Progressivement, ce tissu sera remodelé par les ostéoclastes et ostéoblastes, permettant de recréer les structures corticales et médullaires natives (88).

La régulation de ce processus met en jeu de nombreux facteurs :

- Biophysiques : les contraintes mécaniques exercées sur le foyer de fracture modulent la différenciation des précurseurs en chondrocytes et/ou en ostéoblastes : une plus grande proportion de tissu cartilagineux sera formée autour d'une fracture instable.
- L'étendue du traumatisme : d'importantes lésions des structures adjacentes (périoste, muscle, vaisseaux) modifieront le nombre et l'origine des cellules

souches recrutées au foyer de fracture : mésenchymateuses (MSC), périostées ou musculaires.

- De nombreux facteurs hormonaux et locaux, actifs sur les ostéoblastes, chondrocytes et leur précurseurs, tels que la parathormone, les œstrogènes, les bone morphogenic proteins (BMP), les FGF (2, 4, 18, 9), le Transforming growth factor  $\beta$  (TGF $\beta$ ), ou encore les inhibiteurs de la voie Wnt : la sclérostine et Dickkopf.
- Enfin le système immunitaire joue également un rôle dans la réparation osseuse. L'immunité innée permet l'initiation de la réparation au début de la phase inflammatoire ; puis les cellules souches mésenchymateuses recrutées inhibent localement la réponse immunitaire à travers la production de facteurs paracrines ou d'interactions cellulaires, conduisant à une augmentation locale du nombre de lymphocytes T régulateurs (88).



**Figure 6 : Processus de réparation d'une fracture fémorale. D'après (88).** Deux phases métaboliques (barres marron) sont décrites au cours de la réparation osseuse : une première phase anabolique, liée au recrutement et à la différenciation de cellules souches, conduisant à la formation d'un cal. Elle est suivie par une deuxième phase, catabolique, qui consiste en la résorption de ce cal. D'un point de vue biologique, on décrit trois phases (barres bleues) : inflammatoire, enchondrale, puis de remodelage. Les différents types cellulaires et précurseurs sont présentés à chaque étape. PMN : polynucléaire.

Il existe de nombreux modèles précliniques de réparation osseuse, mais il reste difficile d'identifier un modèle expérimental capable de mimer les événements proches de ceux lors de la réparation osseuse chez l'homme. De plus, leur utilisation en recherche pose des problèmes logistiques et financiers.

La grande majorité des modèles d'invalidation génétique ont été développés chez la souris. Ainsi, les rongeurs sont de plus en plus utilisés en recherche pré-clinique pour des raisons de coûts et de disponibilités. De nombreux modèles murins ont été décrits. On distingue les modèles de fractures osseuses, des modèles de lésions osseuses. Les premiers soulèvent le problème de la reproductibilité sur un grand nombre d'animaux, mais surtout celui de la stabilisation du foyer de fracture. De plus ils nécessitent des techniques chirurgicales (clou médullaire, broche, fixateur externe) qui peuvent éventuellement induire des dommages médullaires (89).

Les lésions osseuses ou les perforations osseuses modélisent les lésions créées chirurgicalement dans le cadre d'exérèses tumorales, prélèvements de greffons osseux, remplacements ligamentaires. Ils sont plus reproductibles, et permettent d'étudier l'effet de thérapies cellulaires, facteurs de croissance ou biomatériaux sur la réparation osseuse. Qu'il s'agisse de fractures ou de perforations osseuses, les conditions doivent être standardisées puisque la souche, l'âge, le sexe des souris, mais encore l'analgésie post opératoire peuvent influencer la réparation osseuse (89).

Monfoulet *et al.* ont décrit chez la souris C57BL6 un modèle de réparation du tissu spongieux en précisant la cinétique de réparation en microtomographie haute résolution à rayons X et en analyse histologique. Des perforations de 0,9 mm de diamètre ont été créées dans la région épi-métaphysaire proximale du fémur de souris âgées de 14 semaines. La réparation osseuse débutait dans la partie la plus profonde de la lésion, à partir des travées restantes, puis se propageait vers la corticale. Après 14 jours, le tissu réparé présentait des caractéristiques d'os primaire (nombre de travées élevées, faible densité minérale) puis était remodelé pour atteindre les caractéristiques d'un os spongieux au 28<sup>ème</sup> jour. La réparation corticale était incomplète 90 jours après création des lésions (90).

### III. OBJECTIFS

L'objectif de ce travail est d'étudier les modalités de régénération osseuse dans un contexte d'insuffisance rénale chronique, en comparant :

- La cinétique de reconstruction osseuse pour identifier un éventuel retard de régénération du tissu osseux,
- La microarchitecture du tissu réparé dans une lignée de souris invalidées pour le gène de l'apolipoprotéine E, qui est un modèle de calcifications vasculaires associées à la MRC, et une lignée de souris sauvages, nommée C57BL6.

Pour ce faire, la moitié des souris de chaque lignée ont été rendues insuffisantes rénales en utilisant un modèle de réduction néphronique chirurgical. La deuxième moitié de ces deux groupes (souris sauvages et souris invalidées) a conservé une fonction rénale normale.

Ce modèle expérimental d'insuffisance rénale a été dans un premier temps validé d'un point de vue physiopathologique à l'aide de dosages plasmatiques réalisés dans les différents groupes (urée, calcium and phosphate, FGF-23 et PTH).

Puis, les lésions osseuses ont été créées au niveau de la métaphyse proximale du fémur de chaque souris, d'après le modèle de réparation trabéculaire décrit par *Monfoulet et al.*(90).

L'analyse du tissu néoformé a été réalisée après deux et quatre semaines de réparation, par microtomographie à rayons X haute résolution, et par analyses histologiques.

Ce travail a fait l'objet d'un article qui sera proposé à publication dans le Journal « *Bone* ».



## IV. ARTICLE

### **Title**

Analysis of bone tissue regeneration in ApoE deficient mice with Chronic Renal Failure

### **Authors/address**

PERBOS Emma<sup>ab\*</sup>, Olivier Chassande<sup>a</sup>, Ziad Massy<sup>c</sup>, Marie-Hélène Lafage-Proust<sup>d</sup>, Christian Combe<sup>ab</sup>, Joëlle Amedee<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Inserm, U1026, Tissue Bioengineering, Bordeaux, France

University of Bordeaux, Bordeaux, France.

<sup>b</sup> Service de Néphrologie Transplantation Dialyse, CHU de Bordeaux, Bordeaux, France.

<sup>c</sup> Inserm U-1088, UPJV, Amiens, France; Service de néphrologie, hôpital Ambroise-Paré, UVSQ, Boulogne-Billancourt, France.

<sup>d</sup> Laboratoire de Biologie Intégrée du Tissu Osseux, INSERM U 1059, Saint-Etienne, France ; Université de Lyon , Lyon, France.

### **Keywords**

Bone regeneration

Chronic Renal Failure

Mineral and bone disorders

ApoE<sup>-/-</sup> mouse

### **Highlights**

- We studied trabecular bone repair in ApoE<sup>-/-</sup> mice with chronic renal failure.
- The newly-formed trabecular bone exhibits microarchitectural changes with increased bone volume, and a denser trabecular network, consistent with a high turnover.
- Kinetics of bone repair is not modified by chronic renal failure or ApoE deficiency.

## **Abstract**

*Background:* Mineral and bone disorders associated with chronic renal failure (CRF) are responsible for changes in bone microarchitecture and strength. Bone fractures are highly frequent among the CRF population, and responsible for an increase in hospitalization rates and death. Apolipoprotein E deficient (ApoE<sup>-/-</sup>) mice, when challenged with CRF, develop vascular calcifications and bone turnover, mineralization and volume changes similar to those observed in CRF patients. The aim of our study was to characterize bone repair in ApoE deficient mice challenged with CRF, as a model of mineral and bone disorders associated with CRF.

*Methods:* We created epimetaphyseal femoral defects in 13-weeks-old female C57BL6 and ApoE<sup>-/-</sup> mice which previously underwent surgical nephron reduction or sham operations. Bone tissue regeneration was analyzed after 2 and 4 weeks using three-dimensional micro-computed tomography and histological examination.

*Results:* Plasmatic intact parathormone and FGF-23 levels were significantly superior in CRF mice than in sham operated, in ApoE<sup>-/-</sup> and C57BL6 groups. Interestingly, Apo E deficiency seemed to influence FGF-23 level as it was significantly higher in ApoE<sup>-/-</sup> control group than in C57BL6 controls. Bone repair in ApoE<sup>-/-</sup> mice with CRF creates a trabecular tissue with increased bone volume and histological features of high turnover. The bone defect model and the time-point analysis used in our study did not allow us to observe cortical healing. The increase in trabecular bone volume in ApoE<sup>-/-</sup> CRF mice defects was not due to a faster or more efficient bone repair, but to modifications in bone micro-architecture: the newly formed trabecular bone was larger, with a denser trabecular network, and a tendency to an increase in trabeculae.

*Conclusion:* Chronic renal failure modifies trabecular bone healing in mice, leading to micro architectural changes, consistent with a high turnover osteodystrophy.

## 1. Introduction

Advanced chronic renal failure (CRF) is associated with numerous metabolic disturbances. Phosphate retention, acidosis, pro-inflammatory state and impaired nutritional status favor the development of mineral and bone disorder. This recently-defined entity, named Chronic Kidney Disease-Mineral and Bone Disorders, brings together mineral and bone laboratory values, bone histological abnormalities, fractures, impaired growth in children and cardiovascular calcifications, commonly observed in CRF patients (7).

The decrease in circulating  $\alpha$ -Klotho and FGF-23 blood level are the first evidence of mineral metabolism disturbances observed in the course of CRF (8). FGF-23 is a circulating hormone secreted by osteocytes and osteoblasts. It binds to FGF receptor and its specific co-receptor  $\alpha$ -Klotho, to promote phosphaturia and a decline in active vitamin D. Along with a decrease in functional renal tissue, suppression of  $1\alpha$ -hydroxylase by FGF-23 causes impairment in intestinal calcium absorption and leads to hypocalcemia and increased parathyroid hormone (PTH). PTH maintains serum calcium levels and increases serum phosphate levels through the stimulation of bone turnover, resulting in alterations of bone architecture (8,28).

The term “renal osteodystrophy” gathers all bone architectural changes seen in CRF patients. They are the result of turnover, mineralization and bone volume changes, and therefore are responsible for higher bone fragility. Adynamic bone disease and osteitis fibrosa are the more frequently observed phenotypes (14). Bone fractures, and more precisely hip fractures, are highly frequent in CRF patients, and associated with a high mortality and hospitalization rate (43–45). So far, little is known about the underlying mechanisms of bone repair in the context of CRF.

Regarding experimental models, Apolipoprotein E deficient (ApoE<sup>-/-</sup>) model is widely used to study atherosclerosis. Indeed, ApoE<sup>-/-</sup> mice show impaired clearing of plasma lipoproteins and they develop atherosclerosis in a short time (83). In the context of CRF, ApoE<sup>-/-</sup> mice display accelerated atherosclerosis (84) with larger areas of atheromatous and medial calcification than non-uremic ApoE<sup>-/-</sup> mice (81). Therefore it has been proposed as a model of chronic kidney disease-associated bone and mineral disorder. The study of bone remodeling in ApoE<sup>-/-</sup> CRF mice showed an increase in

trabecular and cortical bone mass, associated with evidences of high turnover, consistent with osteitis fibrosa (86).

In the context of bone tissue regeneration, bone repair requires cellular recruitment, including mesenchymal stem cells, their differentiation to osteoblastic lineages, and synthesis of a mineralized and vascularized extracellular matrix (91). As CRF modifies the hormonal environment, creates acidosis and accumulation of uremic toxins (2), it may modify the course of bone healing.

Taken together, the aim of our study was to characterize bone repair in ApoE deficient mice associated with CRF, in terms of tissue microarchitecture, using an epimetaphyseal bone defect model previously designed (90).

## **2. Materials & Methods**

### **2.1 Animals, experimental procedures and diet**

C57BL-6 and ApoE<sup>-/-</sup> female mice were purchased from Charles Rivers Breeding Laboratories (Wilmington, MA), and bred at the University of Bordeaux (Bordeaux, France). They were housed in polycarbonate cages, in a pathogen-free facility set on a 12 hour light-dark cycle and given free access to chow diet and water. The diet (Scientific Animal Food & Engineering, Augy, France) contained 16 % protein, 3 % fat, 0.33% calcium, 0.59 % phosphorus and 1000 UI/kg vitamin D<sub>3</sub>.

Animal experiments were performed in accordance with the “Principles of Laboratory Animal Care” recommended by the National Society for Medical Research in France. Interventions were carried out in an accredited animal facility (authorization n° A33-063-917) at the University of Bordeaux, under authorization n° B3310023 of the French Ministry of Agriculture and were approved by the Animal Ethic Committee of the University of Bordeaux.

### **2.2 CRF surgical experimental model in mice**

We used a two-step procedure to create CRF, using 8-week old female ApoE<sup>-/-</sup> mice and Wild Type (WT) C57BL6 mice. Anesthesia was induced with a mixture of 4 % isoflurane/ Air 1-2 L / min (Baxter, Deerfield/ IL, USA) and was maintained at 2 % isoflurane/ Air 0,8 L / min during the isurgery. A stable body temperature was assured by the use of a heating device.

Then, we applied cortical electrocautery to the left kidney through a 2-cm flank incision and performed right nephrectomy through a similar incision, 2 weeks later. (80,81,86). Control animals received sham operation that included flank incision and exteriorization of both kidneys. Special care was taken to avoid damage to the adrenals.

### **2.3 Bone defects**

Three weeks after creation of CRF or sham surgery, holes (1 mm) were created in the femoral condyle, in a region centered on the distal growth plate, encompassing metaphyseal and epiphyseal areas (90). Anesthesia was induced as previously described, bone defects were carried out using an electric drill (Harvard Apparatus, Cambridge, MA) at 10,000 rpm. Bone defects were around 1.5 mm deep and were rinsed with physiological solution NaCl 0.9 % (w/v).

### **2.4 Blood sample analysis**

Blood was collected two weeks after creation of CRF, using a retro-orbital sampling technique, under anesthesia. Plasma concentrations of urea, calcium and phosphate were assessed by the *Centre de Recherche sur l'Inflammation* (Paris, France) using an Olympus AU 400 auto-analyzer (Beckman Coulter, Fullerton, CA). Mouse intact parathyroid hormone was quantified using a two-site ELISA (Immutopics, Quidel, France). We also assessed mouse Fibroblast Growth Factor-23 (FGF-23) using a two site FGF-23 (C-Term) ELISA assay (Immutopics, Quidel, France), according to the manufacturer's instructions.

### **2.5 Three-dimensional micro-computed tomography**

X-Ray micro-computed tomography (micro-CT) was performed to analyze bone tissue regeneration within bone defects performed in the four groups. Equal numbers of mice from each group were euthanized by an overdose of CO<sub>2</sub> at 2 and 4 weeks after creation of bone defects. Samples were fixed in 4 % (w/v) paraformaldehyde in PBS 0.1M pH 7 and femurs were scanned in an Explore Locus SP X-Ray micro-CT device (General Electric, Milwaukee, WI) at an isotropic resolution of 16 μm. Reconstruction of the epi-metaphyseal region was performed following correction of the rotation center and calibration of the mineral density. Bone analysis was performed using Advanced Bone Analysis<sup>TM</sup> software (General Electric). The region of interest (ROI) was bordered by the defect edges and encompassed the areas containing newly

formed bone, excluding the outer boundary that faced the cortical gap (fig.1b). Thresholding of gray values was performed in order to separate mineralized elements from background. Cancellous bone volume / total volume (BV/TV), trabecular number (TbN), trabecular thickness (TbTh), and the density of mineralized tissue (TMD) were measured in cancellous bone. Gap filling was quantified from one 2D longitudinal micro-CT image positioned to the central axis of the defect. It represented the distance between the outer edge of newly formed bone and the defect bottom.

## **2.6 Bone histology**

After micro-CT analysis, samples were decalcified (Q Path DC1, Labonord, Paris, France), then dehydrated and finally embedded in paraffin. Longitudinal sections (7  $\mu$ m thick) were prepared using a microtome (Leica, Deerfield, IL), and stained with Masson's Trichrome.

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

## **2.7 Statistical analysis**

Results are expressed as mean  $\pm$  SD. Differences between groups were analyzed by Kruskal Wallis test, unpaired t-test and Mann-Whitney test (in the ApoE<sup>-/-</sup> population, as the size of the group was generally too small to assess normal distribution). Differences between groups were considered significant at  $p < 0.05$ .

# **3. Results**

## **3.1 CRF experimental model validation**

As expected, nephron reduction significantly increased plasma urea levels in both the C57BL6 and the ApoE<sup>-/-</sup> CRF groups, compared to the respective sham populations (fig.2). Calcium level was also significantly superior in CRF mice, but we did not find any difference on phosphatemia between CRF and sham animals in both genotypes (fig.2).

PTH was significantly higher in CRF groups than in sham groups: respectively 379  $\pm$  122 pg/mL *versus* (vs) 128  $\pm$  73 pg/mL ( $p < 0.05$ ) in C57BL6 mice and 203  $\pm$  143 pg/mL vs 81  $\pm$  30 pg/mL ( $p = 0.0175$ ) in ApoE<sup>-/-</sup> mice (fig.3a). We found no significant differences in plasma PTH levels between C57BL6 and ApoE<sup>-/-</sup> animals with similar renal function.

FGF-23 levels were also increased in both CRF groups: 1162 +/- 417 pg/mL vs 224 +/- 67 pg/mL ( $p=0.0012$ ) in C57BL6 mice and 755 +/- 216 pg/mL vs 365 +/- 62 pg/mL ( $p=0.0095$ ) in ApoE<sup>-/-</sup>. FGF-23 levels were significantly higher in ApoE<sup>-/-</sup> control group than in C57BL6 controls ( $p=0.0047$ ), while there was no difference between the two CRF groups (fig.3b).

### 3.2 Mice outcomes

Before randomization, ApoE<sup>-/-</sup> mice body weight was significantly higher than in their wild-type counterparts: 20 +/- 0.8 g vs 18.5 +/- 1 g ( $p=0.001$ ) in the sham population and 19.9 +/- 1.1 g vs 18.3 +/- 0.8 g in the CRF population ( $p=0.0003$ ) (fig.4a). This body weight difference between ApoE<sup>-/-</sup> and C57BL6 animals was still observed after 2 weeks of renal failure (fig.4b). Moreover, mice of the C57BL6 CRF group exhibited a smaller body weight in comparison to the respective sham group, with 19.9 +/- 1 g in the CRF group vs 21 +/- 1.1 g in controls ( $p=0.004$ ) (fig.4b).

After CRF creation or sham surgery, followed by the bone defect surgery, we observed more bone fractures in ApoE<sup>-/-</sup> mice than in C57BL6: 11/40 vs 1/60. More precisely, fractures were more frequent in ApoE<sup>-/-</sup> controls: 8/21 (38 %) than in ApoE<sup>-/-</sup> CRF mice: 3/19 (15 %). In the C57BL6 population, the only fracture we observed was in the control group.

Four mice died during the experimental study, all of them were ApoE deficient. One died before the beginning of the study; another one was euthanized during the first surgical procedure of CRF creation, because of a renal deformation. Finally, two animals from the ApoE<sup>-/-</sup> CRF group died from a breakdown of suture line.

### 3.3 Bone repair analysis

Bone volume fraction (BV/TV) within the defect was not different between C57BL6 CRF and WT groups after 2 and 4 weeks of bone repair. In ApoE<sup>-/-</sup> mice, BV/TV was significantly higher in the CRF groups compared to sham groups, after 2 weeks ( $p=0.01$ ) and 4 weeks of bone repair ( $p=0.03$ ). Moreover, we observed a tendency to a higher BV/TV in ApoE<sup>-/-</sup> mice with renal failure in comparison to wild types with CRF ( $p=0.05$ ).

There were no differences in trabecular thickness (TbTh) after 2 weeks of bone repair. After 4 weeks, TbTh increased in all 4 groups, but with higher amplitude in ApoE<sup>-/-</sup> CRF, compared with C57BL6 CRF (p=0.02) (Table 1).

We observed for all groups a decrease in the number of trabeculae within the newly-formed bone between the 2 weeks and 4 weeks analysis, which is consistent with a remodeling process of the primary bone tissue. Nevertheless, our data pointed out a tendency to a higher TbN in C57BL6 CRF mice (p=0.06) compared to C57BL6 sham mice after 4 weeks. This tendency was also detected in ApoE deficient mice with CRF in comparison to controls, at the latest time point (p=0.07) (Table 1).

The spacing between trabeculae (TbSp) tended to decrease in CRF condition in C57BL6 mice (p=0.06), and was significantly inferior in ApoE<sup>-/-</sup> mice (p=0.03) after 4 weeks of bone repair (Table 1). TbSp was found similar between groups after 2 weeks of bone repair (Table 1).

Tissue mineral density was not significantly different in CRF and controls groups in both genotypes, after 2 or 4 weeks of bone repair (data not shown).

Finally, we found no difference in 2-dimensional gap filling between the four groups, after 2 and 4 weeks of bone repair. This indicates that the kinetic of bone repair was not different among CRF and non-CRF mice, and ApoE deficient or wild type mice (Table 1).

Histological examination of the newly formed tissue showed the presence of a primary woven bone at the bottom of the bone defect at 2 weeks, spreading to the top of the defect at 4 weeks. Within this tissue, we observed a random organization and density of collagen fibers. A fibrous, collagenous tissue occupied the upper part of the defect (fig.5 g-h, black stars). The growth plate was almost always disrupted by the lesion. In a few cases, we could observe the formation of a fibro-cartilaginous tissue both inside the defect and spreading out of the cortex, consistent with enchondral bone repair.

Figures 5 g and 5 h illustrate the increase in bone volume, trabecular number and trabecular thickness observed in the newly formed bone of ApoE<sup>-/-</sup> CRF mice at 4 weeks in comparison to ApoE<sup>-/-</sup> WT mice.



## 4. Discussion

This study aimed to describe the microarchitecture of the newly-formed tissue after bone injury in a mice model of CRF-associated mineral and bone disorder. We observed that trabecular bone repair in ApoE<sup>-/-</sup> mice with CRF creates a trabecular tissue with increased bone volume and histological features of osteitis fibrosa. In our study, the high-trabecular bone volume in ApoE<sup>-/-</sup> CRF mice defects is not due to a faster or more efficient bone repair, but to modifications in bone micro-architecture.

Wild type and ApoE<sup>-/-</sup> mice with chronic renal failure exhibited CRF-associated mineral and bone disorder biological abnormalities, such as increased parathyroid hormone and increased FGF-23 (figure 3). In this study, there were no differences in phosphatemia, because blood samples were collected at variable time points (fig. 2). Secretion of FGF-23 seemed to be increased by ApoE<sup>-/-</sup> deficiency, as ApoE<sup>-/-</sup> mice without CRF had higher FGF-23 than C57BL6 sham mice (figure 3). FGF-23 is secreted mainly by osteocytes and osteoblasts. It has been demonstrated that ApoE deficiency interferes with osteoblasts physiology in preventing the gamma-carboxylation of osteocalcin, and therefore modifying bone remodeling (92). Increased turnover may induce the release of low-molecular weight fibroblast growth factors, that are known to increase FGF-23 synthesis by the bone (13).

Here, we chose a model of epi-metaphyseal bone defect previously developed in our laboratory. When applied to C57BL6 mice of 14 weeks of age, this model shows that bone formation begins at the bottom of the lesion and fills the cavity 8 weeks after surgery. The primary woven bone is progressively remodeled in mature cortical bone during the first 28 days. The cortical bone is not totally repaired after 90 days (90). Our study was not designed to observe cortical bone healing, but direct bone repair as the main mechanism of bone healing. Nevertheless, in a few cases, we observed evidences of enchondral bone repair, a marker of mechanical instability.

Two weeks after drilling of epi-metaphyseal defects, we observed the formation of a trabecular tissue with micro-CT and histological features of a primary bone. After 4 weeks, instead of a progressively remodeling into a lamellar bone, ApoE<sup>-/-</sup> CRF bone samples showed increased bone volume, with a denser network, and a tendency to more numerous trabeculae (Table 1a). We also observed an increase in trabecular thickness when compared to C57BL6 mice with CRF (Table 1b). These modifications of trabecular micro-architecture mimick CRF induced osteitis fibrosa. Moreover,

histological examination of ApoE<sup>-/-</sup> / CRF mice's bone tissue was consistent with osteitis fibrosa. An additional argument is the confirmation of secondary hyperparathyroidism in ApoE<sup>-/-</sup> mice with CRF (fig. 3). However, we did not observe any sign of marrow fibrosis, probably due to the short duration of renal failure (3 and 5 weeks).

The number and density of trabeculae also tended to increase in WT after 4 weeks of bone repair, expressing the role of CRF in micro-architectural changes.

As mentioned earlier, ApoE deficiency itself modifies bone turnover, and enhances the high bone volume phenotype. Previous studies showed that ApoE deficiency interferes with bone biology (86,92). An hypothesis is that lack of apolipoprotein E prevents capitation of vitamin K and other liposolubles molecules by osteoblasts. Consequently, vitamin K-dependent proteins such as osteocalcin, a regulator of bone formation and mineralization (93), are no longer functional, leading to perturbations of bone remodeling.

Moreover, apolipoprotein E is a known regulator of inflammatory cells during the atheromatosis process; it influences the polarity and inflammatory phenotypes of the macrophages, and can control monocyte activation (94). Those cells may influence the healing process: macrophages are recruited in the early inflammatory phase of bone repair, and osteoclasts precursors are derived from monocytes. Notably, Nikolov *et al.* described a tendency to a decline in osteoclastic activity in trabecular bones of ApoE<sup>-/-</sup> mice with CRF (86). Further studies are needed to clarify whether ApoE deficiency alters inflammatory cells and osteoclastic differentiation during bone repair.

Chronic renal failure modifies trabecular bone healing in mice, leading to micro architectural changes. The newly formed trabecular bone is larger, with a denser trabecular network, and a tendency to an increase in trabeculae (Table 1a). Such changes are consistent with a high turnover osteodystrophy, or osteitis fibrosa. The ApoE<sup>-/-</sup> model is a useful tool for pre-clinical studies of vascular calcifications in uremia (81). Nevertheless, we and others, observed that ApoE deficiency itself modifies bone architecture (86,92).

In conclusion, this genetic and experimental model allow us to identify some differences in the nature of the newly bone tissue regenerated after bone defect within the four groups, although the kinetic of bone repair between the CRF groups seems

identical. It would have been now interesting to analyze the mechanical properties of the newly formed tissues.

### **Acknowledgments**

The authors would like to thank the institutions of Inserm (National Institute for Health and Medical Research), University of Bordeaux, for financial support, as well as the French Nephrology Society.

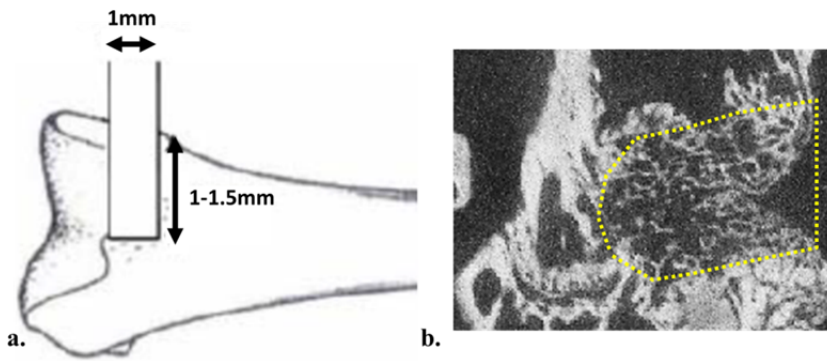
Thanks to the Laboratory Animal Care Facility (A1) for housing and care taking of the rats. The help of Letitia Medan, Myriam Touati and their co-workers is highly acknowledged.

The authors also would like to thank The Technological Biomedical Innovation Platform (PTIB) at the University of Bordeaux for Micro-CT analysis.

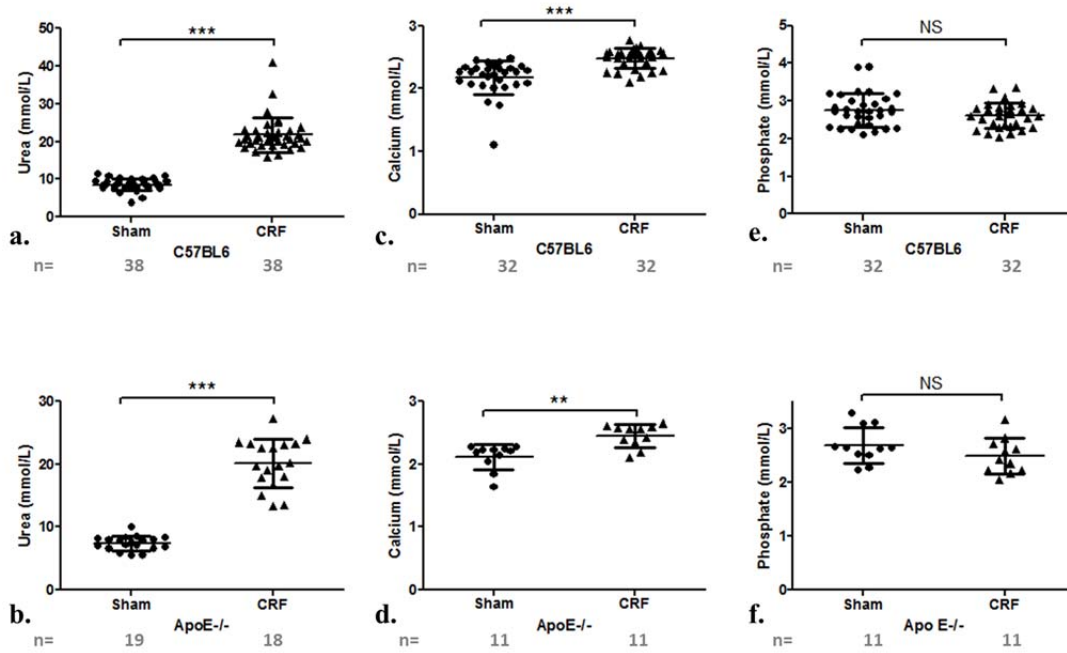
## References

1. Moe S, Drüeke T, Cunningham J et al. Definition, evaluation, and classification of renal osteodystrophy: a position statement from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). *Kidney international* 2006; 69: 1945.
2. Hu MC, Shiizaki K, Kuro-o M, Moe OW. Fibroblast Growth Factor 23 and Klotho: Physiology and Pathophysiology of an Endocrine Network of Mineral Metabolism. *Annual Review of Physiology* 2013; 75: 503.
3. Wesseling-Perry K, Jüppner H. The osteocyte in CKD: New concepts regarding the role of FGF23 in mineral metabolism and systemic complications. *Bone* 2013; 54: 222.
4. Mac Way F, Lessard M, Lafage-Proust M-H. Pathophysiology of chronic kidney disease-mineral and bone disorder. *Joint Bone Spine* 2012; 79: 544.
5. Dooley AC, Weiss NS, Kestenbaum B. Increased Risk of Hip Fracture Among Men With CKD. *American Journal of Kidney Diseases* 2008; 51: 38.
6. Nitsch D, Mylne A, Roderick PJ, Smeeth L, Hubbard R, Fletcher A. Chronic kidney disease and hip fracture-related mortality in older people in the UK. *Nephrology Dialysis Transplantation* 2009; 24: 1539.
7. Tentori F, McCullough K, Kilpatrick RD et al. High rates of death and hospitalization follow bone fracture among hemodialysis patients. *Kidney International* 2014; 85: 166.
8. Meir KS. Atherosclerosis in the Apolipoprotein E-Deficient Mouse: A Decade of Progress. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2004; 24: 1006.
9. Bro S. Chronic Renal Failure Accelerates Atherogenesis in Apolipoprotein E-Deficient Mice. *Journal of the American Society of Nephrology* 2003; 14: 2466-49
10. Massy ZA. Uremia Accelerates both Atherosclerosis and Arterial Calcification in Apolipoprotein E Knockout Mice. *Journal of the American Society of Nephrology* 2004; 16: 109.
11. Nikolov IG, Joki N, Nguyen-Khoa T et al. Chronic kidney disease bone and mineral disorder (CKD-MBD) in apolipoprotein E-deficient mice with chronic renal failure. *Bone* 2010; 47: 156.
12. Shapiro F. Bone development and its relation to fracture repair. The role of mesenchymal osteoblasts and surface osteoblasts. *Eur Cell Mater* 2008; 15: e76.
13. Meyer TW, Hostetter TH. Uremia. *New England Journal of Medicine* 2007; 357: 1316.

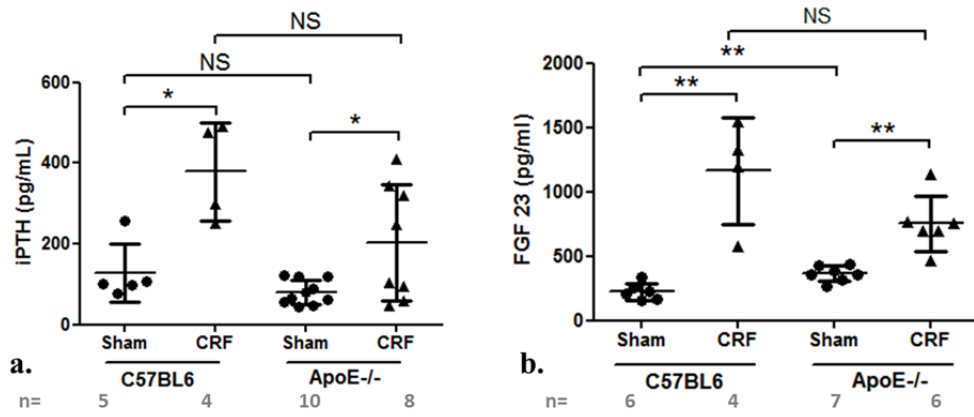
14. Monfoulet L, Rabier B, Chassande O, Fricain J-C. Drilled Hole Defects in Mouse Femur as Models of Intramembranous Cortical and Cancellous Bone Regeneration. *Calcified Tissue International* 2009; 86: 72.
15. Gagnon R, Gallimore B. Characterization of a mouse model of chronic uremia. *Urological research* 1988; 16: 119.
16. Schilling AF, Schinke T, Münch C et al. Increased Bone Formation in Mice Lacking Apolipoprotein E. *Journal of Bone and Mineral Research* 2004; 20: 274.
17. Silver J, Naveh-Many T. FGF-23 and secondary hyperparathyroidism in chronic kidney disease. *Nature Reviews Nephrology* 2013; 9: 641.
18. Neve A, Corrado A, Cantatore FP. Osteocalcin: Skeletal and extra-skeletal effects. *Journal of Cellular Physiology* 2013; 228: 1149.
19. Baitsch D, Bock HH, Engel T et al. Apolipoprotein E Induces Antiinflammatory Phenotype in Macrophages. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2011; 31: 1160.



**Figure 1. (a) Position of the epi-metaphyseal defect on mice distal femoral epiphysis. (b) Delineation of the ROI (yellow dots) of newly formed cancellous bone in epimetaphyseal defects.**

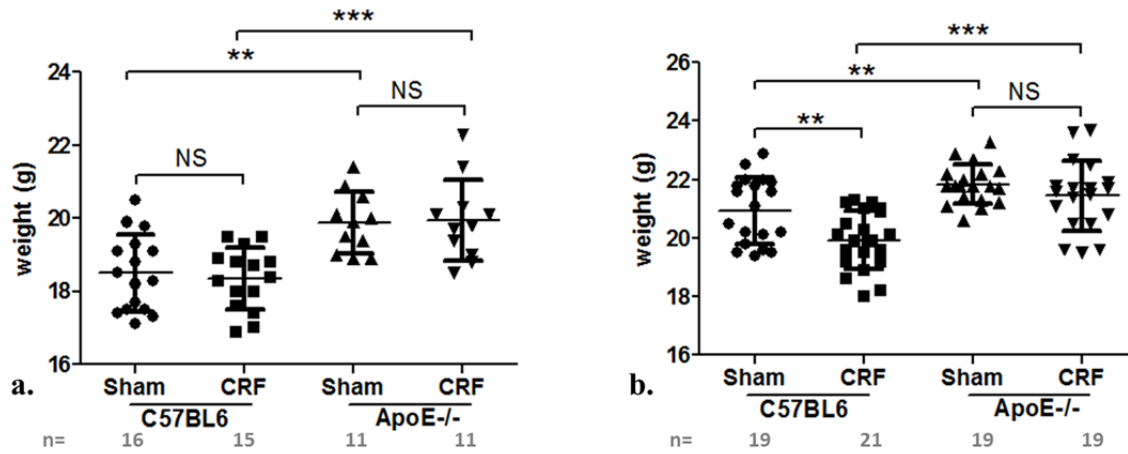


**Figure 2. Plasmatic concentration of urea (a: C57BL6, b: ApoE-/-), calcium (c: C57BL6, d: ApoE-/-), and phosphate (e: C57BL6, f: ApoE-/-).** Mice were subjected to either sham operations (sham) or a two-step nephron reduction leading to chronic renal failure (CRF). \*\* $p < 0.0025$ ; \*\*\* $p < 0.0001$ .



**Figure 3. Plasmatic concentrations of intact parathormone (iPTH) (a) and FGF-23 (b) in ApoE deficient mice and C57BL6 mice, after nephron reduction (CRF) or in controls (sham). \*p<0.05; \*\*p<0.0025.**





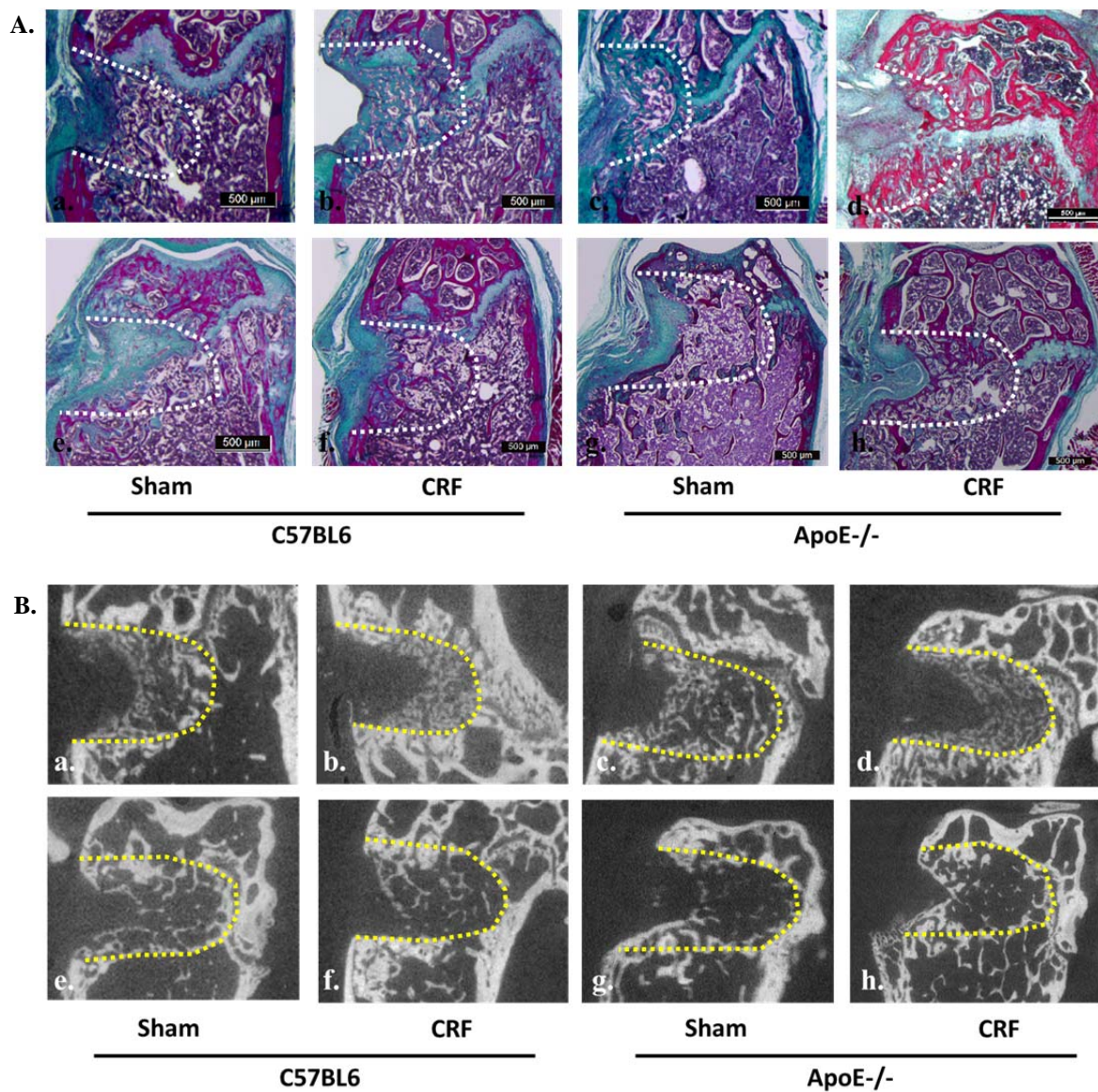
**Figure 4.** Mice body weight at randomization (age= 8 weeks) (a) and 2 weeks after nephrectomy (CRF group) or the second sham surgery (sham group) (age= 12 weeks) (b). \*\* $p < 0.0025$  ; \*\*\* $p < 0.0001$ .

	2 weeks						4 weeks					
	C57BL6		P	ApoE <sup>-/-</sup>		p	C57BL6		P	ApoE <sup>-/-</sup>		p
	Sham	CRF		Sham	CRF		Sham	CRF		Sham	CRF	
<b>BV/TV (%)</b>	23 ± 6	24 ± 8	NS	21 ± 2	23 ± 6	*	20 ± 7	22 ± 7	NS	19 ± 7	31 ± 10	*
<b>TbTh (mm)</b>	0.02 ± 0.005	0.02 ± 0.004	NS	0.02 ± 0.001	0.02 ± 0.001	NS	0.03 ± 0.005	0.03 ± 0.007	NS	0.03 ± 0.005	0.04 ± 0.01	NS
<b>TbN (/mm<sup>3</sup>)</b>	10.2 ± 1.7	11.5 ± 3.2	NS	11.0 ± 1.5	13.3 ± 3.3	NS	7.5 ± 2.7	8.3 ± 1.4	∩	6.2 ± 1.9	8.0 ± 0.9	∩
<b>TbSp (mm)</b>	0.08 ± 0.02	0.08 ± 0.06	NS	0.07 ± 0.01	0.06 ± 0.01	NS	0.12 ± 0.01	0.10 ± 0.01	∩	0.15 ± 0.07	0.09 ± 0.02	*
<b>2D gap-filling (mm)</b>	0.83 ± 0.25	0.82 ± 0.33	NS	0.99 ± 0.32	0.83 ± 0.17	NS	1.22 ± 0.35	0.97 ± 0.18	NS	1.39 ± 0.36	1.05 ± 0.28	NS

	2 weeks						4 weeks					
	Sham		P	CRF		p	Sham		P	CRF		p
	C57BL6	ApoE <sup>-/-</sup>		C57BL6	ApoE <sup>-/-</sup>		C57BL6	ApoE <sup>-/-</sup>		C57BL6	ApoE <sup>-/-</sup>	
<b>BV/TV (%)</b>	23 ± 6	21 ± 2	NS	24 ± 8	23 ± 6	NS	20 ± 7	19 ± 7	NS	22 ± 7	31 ± 10	∩
<b>TbTh (mm)</b>	0.02 ± 0.005	0.02 ± 0.001	NS	0.02 ± 0.004	0.02 ± 0.001	NS	0.03 ± 0.005	0.03 ± 0.005	NS	0.03 ± 0.007	0.04 ± 0.01	*
<b>TbN (/mm<sup>3</sup>)</b>	10.2 ± 1.7	11.0 ± 1.5	NS	11.5 ± 3.2	13.3 ± 3.3	NS	7.5 ± 2.7	6.2 ± 1.9	NS	8.3 ± 1.4	8.0 ± 0.9	NS
<b>TbSp (mm)</b>	0.08 ± 0.02	0.07 ± 0.01	NS	0.08 ± 0.06	0.06 ± 0.01	NS	0.12 ± 0.01	0.15 ± 0.07	NS	0.10 ± 0.01	0.09 ± 0.02	NS
<b>2D gap-filling (mm)</b>	0.83 ± 0.25	0.99 ± 0.32	NS	0.82 ± 0.33	0.83 ± 0.17	NS	1.22 ± 0.35	1.39 ± 0.36	NS	0.97 ± 0.18	1.05 ± 0.28	NS

**Table 1. Micro-CT analysis of bone micro-architecture within the defect, in C57BL6 and ApoE<sup>-/-</sup> mice with normal (sham) or impaired renal function (CRF).** (a) CRF vs Sham, (b) ApoE<sup>-/-</sup> vs C57BL6. Measurements were performed on micro-CT images, 2 and 4 weeks after bone surgery. BV/TV (%): bone volume fraction; TbTh (μm): trabecular thickness; TbN (/mm): trabecular number; Tb.Sp (mm) trabecular space; 2D gap-filling (mm): length of newly-formed tissue filling the bottom of the defect. \*p<0.05, ∩ p<0.1.



**Figure 5. A: histological analysis of newly formed bone after 2 (a-d) and 4 weeks (e-h) of bone repair:** representative images from C57BL6 controls (a, e), C57BL6 CRF mice (b, f), ApoE<sup>-/-</sup> controls (c, g) and ApoE<sup>-/-</sup> CRF mice (d, h). Seven micrometers sections of decalcified bone were stained with Masson's Trichrome. Defects are delimited in white dots. **B: Micro-CT images of newly formed bone after 2 (a-d) and 4 weeks (e-h) of bone repair:** representative images from C57BL6 controls (a, e), C57BL6 CRF mice (b, f), ApoE<sup>-/-</sup> controls (c, g) and ApoE<sup>-/-</sup> CRF mice (d, h). Seven micrometers sections of decalcified bone were stained with Masson's Trichrome. Defects are delimited in yellow dots.

## V. DISCUSSION ET PERSPECTIVES

### 1. LES MODELES EXPERIMENTAUX D'INSUFFISANCE RENALE ET DE TROUBLES DU METABOLISME MINERAL ET OSSEUX UTILISES DANS NOTRE ETUDE.

La reproduction du modèle de néphrectomie des souris sauvages C57BL6 et invalidées pour le gène de l'apolipoprotéine E nous a permis d'obtenir des souris présentant une insuffisance rénale et des perturbations du métabolisme minéral tels qu'une hyperparathyroïdie secondaire et une élévation du FGF23. Il est à noter que la calcémie des souris insuffisantes rénales était supérieure aux souris contrôles, élément retrouvé dans d'autres études (81).

Nous avons mis en évidence une différence significative entre les taux de FGF23 chez les souris sauvages et les souris ApoE<sup>-/-</sup> non insuffisantes rénales (224,3 pg/ml +/-66 contre 365,0 pg/ml +/-62, respectivement, p=0,0047). Cette différence devra être confirmée par une nouvelle série d'expérimentations et de dosages sériques. Il est possible que l'absence d'apolipoprotéine E perturbe le métabolisme osseux. En effet, l'ostéocalcine et la Matrice-Gla Protéine (MGP) sont deux protéines du métabolisme osseux qui nécessitent, pour être actives, une étape de gamma-carboxylation médiée par la vitamine K. L'absence d'apolipoprotéine E perturbe le métabolisme de la vitamine K, en empêchant la captation des lipoparticules riches en vitamines liposolubles par les cellules comme l'ostéocyte. L'ostéocalcine non carboxylée est incapable d'exercer son effet d'inhibiteur de l'ostéof ormation (93), il en résulte une augmentation du volume osseux (86,92). Une hypothèse pouvant expliquer cette différence dans les dosages de FGF23 entre les groupes ApoE<sup>-/-</sup> et C57BL6 est celle de la libération de FGFs de bas poids moléculaire secondaire à l'augmentation du remodelage osseux, qui sont connus pour stimuler la production osseuse de FGF23 (13). En condition d'insuffisance rénale, nous n'avons pas observé de différence dans les taux de FGF23 plasmatique entre les groupes de souris sauvages et ApoE<sup>-/-</sup>. Cependant il est possible que les effectifs aient été trop faibles pour nous permettre d'observer une telle différence.

Avant randomisation entre les groupes néphrectomisés ou contrôles, le poids des souris sauvages était inférieur à celui des souris ApoE<sup>-/-</sup>. Cette différence à l'état basal n'est pas retrouvée dans d'autres publications (85,92). Dans notre étude, les souris sauvages rendues insuffisantes rénales prenaient moins de poids que les souris

contrôles, probablement en lien avec un certain degré d'anorexie induite par l'urémie. Cette différence n'était pas observée chez les animaux ApoE<sup>-/-</sup>.

## 2. LA REPARATION OSSEUSE DANS CES MODELES EXPERIMENTAUX

Le tissu osseux nouvellement formé après la création de lésions osseuses chez la souris présentait, après quatre semaines de réparation, des caractéristiques d'ostéodystrophie rénale avec une augmentation du taux de remodelage osseux. En effet, le réseau des travées osseuses avait tendance à se densifier dans les deux lignées de souris, avec une augmentation du nombre des travées et une diminution de leur espacement, qui atteignait la significativité dans le groupe ApoE<sup>-/-</sup>. Par ailleurs, le volume osseux du tissu réparé était significativement plus important chez les souris ApoE<sup>-/-</sup> insuffisantes rénales en comparaison avec les souris ayant une fonction rénale conservée. Nous n'avons pas observé de différence significative en termes de minéralisation, les temps étudiés pourraient être trop précoces. Le tissu osseux réparé chez les souris ApoE<sup>-/-</sup> présentait donc des caractéristiques d'ostéite fibrosante, selon la classification TMV (18).

Par ailleurs, l'absence d'apolipoprotéine E semble modifier la réparation osseuse dans le contexte d'insuffisance rénale : le tissu spongieux réparé dans les souris ApoE<sup>-/-</sup> était formé de travées plus épaisses, avec une tendance à une augmentation de son volume en comparaison avec le groupe de souris sauvages. L'effet de l'apolipoprotéine E sur le remodelage osseux a été précédemment décrit par *Nikolov et al.*, qui observaient une augmentation de la masse osseuse chez les souris ApoE<sup>-/-</sup>, et de manière plus marquée en condition d'insuffisance rénale (86).

Plusieurs points méritent d'être discutés à propos de ces résultats. Tout d'abord, il faut préciser que la micro-tomographie à rayons X caractérise la microarchitecture osseuse mais ne permet pas d'estimer le taux de remodelage osseux. Les modifications des travées osseuses que nous avons observées dans le groupe des souris ApoE<sup>-/-</sup> insuffisantes rénales sont les conséquences d'une probable augmentation du remodelage. La technique de référence pour l'évaluation du remodelage reste l'analyse histomorphométrique du tissu osseux (voir II.A.3).

Nous avons jugé raisonnable de prendre en compte des résultats n'atteignant pas le seuil de significativité ( $p < 0.1$ ) compte tenu d'une part des effectifs analysés :  $n=5$  à 8

pour les groupes ApoE<sup>-/-</sup> et n=11 à 16 pour les groupes C57BL6, et d'autre part de l'incertitude liée à l'outil utilisé. En effet, la résolution du micro-scanner est d'environ 10 µm, pour des travées mesurant en moyenne 20 µm d'épaisseur. De plus, la détermination du seuil des nuances de gris, permettant de différencier les éléments minéralisés du bruit de fond peut être sujet à une certaine variabilité, puisque 3 séries de mesures ont été effectuées à plusieurs mois d'intervalle.

La cinétique du processus de réparation osseuse ne semble pas modifiée par l'insuffisance rénale, ni par le phénotype des souris. Il serait intéressant de compléter cette étude de l'architecture du tissu réparé par l'analyse des effets de l'insuffisance rénale chronique sur les différents acteurs de la réparation osseuse : la réaction immunitaire, le recrutement des cellules souches et leur capacités de différenciation, la fonction des cellules ostéo-compétentes matures.

Dans la majorité des échantillons étudiés, les lésions créées étaient en position métaphysaire et interrompaient la plaque de croissance. Ces lésions étaient stables, et nous n'avons pas observé de chondrocytes à l'intérieur ou autour des lésions. A l'opposé, quelques souris provenant essentiellement des groupes ApoE<sup>-/-</sup> présentaient des fractures centrées autour de la lésion osseuse. L'analyse histologique révélait alors un volumineux cal fibro-cartilagineux, traduisant les contraintes mécaniques exercées sur ces lésions. Nous avons recensé 12 fractures au cours de notre étude. Parmi elles, 11 concernaient des souris ApoE<sup>-/-</sup>, issues du groupe insuffisant rénal dans 3 cas sur 11 et issues du groupe contrôle dans la majorité des cas (8/11). Il est possible que ce nombre élevé de fractures soit lié à une fragilité osseuse plus importante, mais cette donnée devra être confirmée par des tests de résistance osseuse.

Il est probable que cette différence soit liée à l'opérateur, la localisation des lésions créées sur l'épiphyse fémorale pouvant être à l'origine d'une instabilité.

### 3. CONCLUSION

En conclusion, la réparation osseuse dans le modèle de TMO-MRC d'invalidation pour le gène de l'apolipoprotéine E conduit à la formation d'un tissu spongieux présentant des caractéristiques d'ostéodystrophie, avec une augmentation du volume et du taux de remodelage osseux. Dans notre travail, la cinétique de réparation ne paraît pas modifiée par l'altération de la fonction rénale. Il serait intéressant de compléter ce

travail par une étude des propriétés mécaniques de ces tissus osseux nouvellement formés.

Dans tous les cas, le processus de réparation osseuse fait intervenir de nombreux acteurs cellulaires et moléculaires potentiellement influencés par la MRC. L'étude des conséquences de l'urémie sur ces différents facteurs (précurseurs, système immunitaire, cellules ostéocompétantes) pourrait apporter des éléments permettant d'expliquer les phénotypes observés, et de compléter la description des perturbations du métabolisme minéral et osseux associées à la MRC.

## VI. REFERENCES

1. Évaluation de la fonction rénale et de la protéinurie pour le diagnostic de la maladie rénale chronique chez l'adulte. Recommandations pour la pratique clinique. *Néphrologie & Thérapeutique* 2009; 5: 302.
2. Meyer TW, Hostetter TH. Uremia. *New England Journal of Medicine* 2007; 357: 1316.
3. Moranne O, Froissart M, Rossert J et al. Timing of Onset of CKD-Related Metabolic Complications. *Journal of the American Society of Nephrology* 2009; 20: 164.
4. Rapport annuel REIN 2012. *Agence de la Biomédecine* 2013;
5. Ortiz A, Covic A, Fliser D et al. Epidemiology, contributors to, and clinical trials of mortality risk in chronic kidney failure. *The Lancet* 2014; 383: 1831.
6. Blotière P-O, Tuppin P, Weill A, Ricordeau P, Allemand H. Coût de la prise en charge de l'IRCT en France en 2007 et impact potentiel d'une augmentation du recours à la dialyse péritonéale et à la greffe. *Néphrologie & Thérapeutique* 2010; 6: 240.
7. Moe S, Drüeke T, Cunningham J et al. Definition, evaluation, and classification of renal osteodystrophy: a position statement from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). *Kidney international* 2006; 69: 1945.
8. Hu MC, Shiizaki K, Kuro-o M, Moe OW. Fibroblast Growth Factor 23 and Klotho: Physiology and Pathophysiology of an Endocrine Network of Mineral Metabolism. *Annual Review of Physiology* 2013; 75: 503.
9. Chattopadhyay N, Brown EM. Role of calcium-sensing receptor in mineral ion metabolism and inherited disorders of calcium-sensing. *Molecular Genetics and Metabolism* 2006; 89: 189.
10. Silver J, Naveh-Many T. Phosphate and the parathyroid. *Kidney international* 2009; 75: 898.
11. Lavi-Moshayoff V, Wasserman G, Meir T, Silver J, Naveh-Many T. PTH increases FGF23 gene expression and mediates the high-FGF23 levels of experimental kidney failure: a bone parathyroid feedback loop. *AJP: Renal Physiology* 2010; 299: F882.
12. Hu MC, Shi M, Zhang J et al. Renal Production, Uptake, and Handling of Circulating  $\alpha$ Klotho. *Journal of the American Society of Nephrology* 2015; 27.
13. Silver J, Naveh-Many T. FGF-23 and secondary hyperparathyroidism in chronic kidney disease. *Nature Reviews Nephrology* 2013; 9: 641.
14. Mac Way F, Lessard M, Lafage-Proust M-H. Pathophysiology of chronic kidney disease-mineral and bone disorder. *Joint Bone Spine* 2012; 79: 544.



15. Gogusev J, Duchambon P, Hory B et al. Depressed expression of calcium receptor in parathyroid gland tissue of patients with hyperparathyroidism. *Kidney international* 1997; 51: 328.
16. Hu MC, Shi M, Zhang J et al. Klotho Deficiency Causes Vascular Calcification in Chronic Kidney Disease. *Journal of the American Society of Nephrology* 2011; 22: 124.
17. De Seigneux S, Courbebaisse M, Rutkowski JM et al. Proteinuria Increases Plasma Phosphate by Altering Its Tubular Handling. *Journal of the American Society of Nephrology* 2014; 26.
18. Lafage-Proust M. Physiopathologie de l'atteinte osseuse au cours de l'insuffisance rénale chronique. *Réalités en Rhumatologie* 2012; 48: 1.
19. Shimamura Y, Hamada K, Inoue K et al. Serum levels of soluble secreted  $\alpha$ -Klotho are decreased in the early stages of chronic kidney disease, making it a probable novel biomarker for early diagnosis. *Clinical and Experimental Nephrology* 2012; 16: 722.
20. Young A, Hodsman AB, Boudville N et al. Bone and Mineral Metabolism and Fibroblast Growth Factor 23 Levels After Kidney Donation. *American Journal of Kidney Diseases* 2012; 59: 761.
21. Klinkhammer BM, Kramann R, Mallau M et al. Mesenchymal Stem Cells from Rats with Chronic Kidney Disease Exhibit Premature Senescence and Loss of Regenerative Potential. *PLoS ONE* 2014; 9: e92115.
22. Feng X, McDonald JM. Disorders of Bone Remodeling. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* 2011; 6: 121.
23. Malluche HH, Mawad HW, Monier-Faugere M-C. Renal osteodystrophy in the first decade of the new millennium: Analysis of 630 bone biopsies in black and white patients. *Journal of Bone and Mineral Research* 2011; 26: 1368.
24. Salam SN, Eastell R, Khwaja A. Fragility Fractures and Osteoporosis in CKD: Pathophysiology and Diagnostic Methods. *American Journal of Kidney Diseases* 2014; 63: 1049.
25. Gonzalez EA, Lund RJ, Martin KJ et al. Treatment of a murine model of high-turnover renal osteodystrophy by exogenous BMP-7. *Kidney international* 2002; 61: 1322.
26. Sabbagh Y, Giorgeti Graciolli F, O'Brien S et al. Repression of osteocyte Wnt $\beta$ -catenin signaling is an early event in the progression of renal osteodystrophy. *Journal of Bone and Mineral Research*, 2012; 27: 1757.

27. Fang Y, Ginsberg C, Sugatani T, Monier-Faugere M-C, Malluche H, Hruska KA. Early chronic kidney disease–mineral bone disorder stimulates vascular calcification. *Kidney international* 2014; 85: 142.
28. Wesseling-Perry K, Jüppner H. The osteocyte in CKD: New concepts regarding the role of FGF23 in mineral metabolism and systemic complications. *Bone* 2013; 54: 222.
29. Pereira RC, Delany AM, Khouzam NM et al. Primary osteoblast-like cells from patients with end-stage kidney disease reflect gene expression, proliferation, and mineralization characteristics ex vivo. *Kidney international [Internet]* 2014; [cited 2015 May 3] Available from: <http://www.nature.com/ki/journal/vaop/ncurrent/full/ki2014347a.html>
30. Ott SM. Bone cells, sclerostin, and FGF23: what’s bred in the bone will come out in the flesh. *Kidney International* 2015; 87: 499.
31. Babayev R, Nickolas TL. Can one evaluate bone disease in chronic kidney disease without a biopsy?: *Current Opinion in Nephrology and Hypertension* 2014; 23: 431.
32. Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD-MBD Work Group. KDIGO clinical practice guideline for the diagnosis, evaluation, prevention, and treatment of chronic kidney disease-mineral and bone disorder (CKD-MBD). *Kidney International* 2009; 76(Suppl 113): S1.
33. London GM. Arterial media calcification in end-stage renal disease: impact on all-cause and cardiovascular mortality. *Nephrology Dialysis Transplantation* 2003; 18: 1731.
34. Moe SM. Vascular Calcification: The Three-Hit Model. *Journal of the American Society of Nephrology* 2009; 20: 1162.
35. Massy ZA, Drüeke TB. Vascular calcification. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension* 2013; 22: 405.
36. Krueger T, Schlieper G, Schurgers L et al. Vitamin K1 to slow vascular calcification in haemodialysis patients (VitaVasK trial): a rationale and study protocol. *Nephrology Dialysis Transplantation* 2014; 29: 1633.
37. Krueger T, Westenfeld R, Ketteler M, Schurgers LJ, Floege J. Vitamin K deficiency in CKD patients: a modifiable risk factor for vascular calcification&quest. *Kidney international* 2009; 76: 18.
38. Barreto DV, Barreto F de C, de Carvalho AB et al. Association of Changes in Bone Remodeling and Coronary Calcification in Hemodialysis Patients: A Prospective Study. *American Journal of Kidney Diseases* 2008; 52: 1139.
39. Skolnick AH, Osranek M, Formica P, Kronzon I. Osteoporosis Treatment and Progression of Aortic Stenosis. *The American Journal of Cardiology* 2009; 104: 122.

40. Brandenburg VM, D'Haese P, Deck A et al. From skeletal to cardiovascular disease in 12 steps—the evolution of sclerostin as a major player in CKD-MBD. *Pediatric Nephrology* [Internet] 2015; [cited 2015 May 8] Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00467-015-3069-7>
41. Pelletier S, Confavreux CB, Haesebaert J et al. Serum sclerostin: the missing link in the bone-vessel cross-talk in hemodialysis patients? *Osteoporosis International* [Internet] 2015; [cited 2015 May 10] Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00198-015-3127-9>
42. Desjardins L, Liabeuf S, Oliveira RB et al. Uremic toxicity and sclerostin in chronic kidney disease patients. *Néphrologie & Thérapeutique* 2014; 10: 463.
43. Dooley AC, Weiss NS, Kestenbaum B. Increased Risk of Hip Fracture Among Men With CKD. *American Journal of Kidney Diseases* 2008; 51: 38.
44. Nitsch D, Mylne A, Roderick PJ, Smeeth L, Hubbard R, Fletcher A. Chronic kidney disease and hip fracture-related mortality in older people in the UK. *Nephrology Dialysis Transplantation* 2009; 24: 1539.
45. Tentori F, McCullough K, Kilpatrick RD et al. High rates of death and hospitalization follow bone fracture among hemodialysis patients. *Kidney International* 2014; 85: 166.
46. Jamal SA, West SL, Miller PD. Fracture risk assessment in patients with chronic kidney disease. *Osteoporosis International* 2011; 23: 1191.
47. Jamal SA. Bone mass measurements in men and women with chronic kidney disease: *Current Opinion in Nephrology and Hypertension* 2010; 19: 343.
48. Tentori F, Blayney MJ, Albert JM et al. Mortality Risk for Dialysis Patients With Different Levels of Serum Calcium, Phosphorus, and PTH: The Dialysis Outcomes and Practice Patterns Study (DOPPS). *American Journal of Kidney Diseases* 2008; 52: 519.
49. Block GA. Mineral Metabolism, Mortality, and Morbidity in Maintenance Hemodialysis. *Journal of the American Society of Nephrology* 2004; 15: 2208.
50. Ganesh SK, Stack AG, Levin NW, Hulbert-Shearon T, Port FK. Association of elevated serum PO<sub>4</sub>, CaxPO<sub>4</sub> product, and parathyroid hormone with cardiac mortality risk in chronic hemodialysis patients. *Journal of the American Society of Nephrology* 2001; 12: 2131.
51. Gutiérrez OM, Mannstadt M, Isakova T et al. Fibroblast growth factor 23 and mortality among patients undergoing hemodialysis. *New England Journal of Medicine* 2008; 359: 584.

52. Stubbs JR, Liu S, Tang W et al. Role of Hyperphosphatemia and 1,25-Dihydroxyvitamin D in Vascular Calcification and Mortality in Fibroblastic Growth Factor 23 Null Mice. *Journal of the American Society of Nephrology* 2007; 18: 2116.
53. Gutierrez OM, Januzzi JL, Isakova T et al. Fibroblast Growth Factor 23 and Left Ventricular Hypertrophy in Chronic Kidney Disease. *Circulation* 2009; 119: 2545.
54. Fernandez-Martin JL, Martinez-Cambolor P, Dionisi MP et al. Improvement of mineral and bone metabolism markers is associated with better survival in haemodialysis patients: the COSMOS study. *Nephrology Dialysis Transplantation* [Internet] 2015; [cited 2015 May 27] Available from: <http://ndt.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/ndt/gfv099>
55. Zoccali C, London G. Con: Vascular calcification is a surrogate marker, but not the cause of ongoing vascular disease, and it is not a treatment target in chronic kidney disease. *Nephrology Dialysis Transplantation* 2015; 30: 352.
56. Bover J, Evenepoel P, Urena-Torres P et al. Pro: Cardiovascular calcifications are clinically relevant. *Nephrology Dialysis Transplantation* 2015; 30: 345.
57. Llach F, Massry S. On the Mechanism of Secondary Hyperparathyroidism in Moderate Renal Insufficiency. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 1985; 61: 601.
58. Moorthi RN, Moe SM. CKD–Mineral and Bone Disorder: Core Curriculum 2011. *American Journal of Kidney Diseases* 2011; 58: 1022.
59. Block GA, Fishbane S, Rodriguez M et al. A 12-Week, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial of Ferric Citrate for the Treatment of Iron Deficiency Anemia and Reduction of Serum Phosphate in Patients With CKD Stages 3-5. *American Journal of Kidney Diseases* 2015; 65: 728.
60. Chertow GM, Burke SK, Raggi P. Sevelamer attenuates the progression of coronary and aortic calcification in hemodialysis patients. *Kidney international* 2002; 62: 245.
61. Block GA, Raggi P, Bellasi A, Kooienga L, Spiegel DM. Mortality effect of coronary calcification and phosphate binder choice in incident hemodialysis patients. *Kidney international* 2007; 71: 438.
62. Block GA, Wheeler DC, Persky MS et al. Effects of Phosphate Binders in Moderate CKD. *Journal of the American Society of Nephrology* 2012; 23: 1407.
63. St Peter W, Jiannong L, Weinhandl E, Fan Q. A comparison of sevelamer and calcium-based phosphate binders on mortality, hospitalization, and morbidity in hemodialysis: a secondary analysis of the Dialysis Clinical Outcomes Revisited (DCOR) randomized trial using claims data. *American Journal of Kidney Diseases* 2008; 51: 445.

64. Jamal SA, Vandermeer B, Raggi P et al. Effect of calcium-based versus non-calcium-based phosphate binders on mortality in patients with chronic kidney disease: an updated systematic review and meta-analysis. *The Lancet* 2013; 382: 1268.
65. Drüeke TB. Which vitamin D derivative to prescribe for renal patients. *Current opinion in nephrology and hypertension* 2005; 14: 343.
66. Moe SM, Thadhani R. What have we learned about chronic kidney disease-mineral bone disorder from the EVOLVE and PRIMO trials?: *Current Opinion in Nephrology and Hypertension* 2013; 22: 651.
67. Tonelli M, Pannu N, Manns B. Oral phosphate binders in patients with kidney failure. *New England Journal of Medicine* 2010; 362: 1312.
68. Raggi P, Chertow GM, Torres PU et al. The ADVANCE study: a randomized study to evaluate the effects of cinacalcet plus low-dose vitamin D on vascular calcification in patients on hemodialysis. *Nephrology Dialysis Transplantation* 2011; 26: 1327.
69. The EVOLVE Trial Investigators. Effect of Cinacalcet on Cardiovascular Disease in Patients Undergoing Dialysis. *New England Journal of Medicine* 2012; 367: 2482.
70. Toussaint N, Lau K, Strauss B, Polkinghorne K, Peter G Kerr. Effect of Alendronate on Vascular Calcification in CKD Stages 3 and 4: A Pilot Randomized Controlled Trial. *American Journal of Kidney Diseases* 2010; 56: 57.
71. Hartle JE, Tang X, Kirchner HL et al. Bisphosphonate Therapy, Death, and Cardiovascular Events Among Female Patients With CKD: A Retrospective Cohort Study. *American Journal of Kidney Diseases* 2012; 59: 636.
72. Block GA, Bone HG, Fang L, Lee E, Padhi D. A single-dose study of denosumab in patients with various degrees of renal impairment. *Journal of Bone and Mineral Research* 2012; 27: 1471.
73. Chen C-L, Chen N-C, Liang H-L et al. Effects of Denosumab and Calcitriol on Severe Secondary Hyperparathyroidism in Dialysis Patients with Low Bone Mass. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2015; : jc.2015.
74. Malluche HH, Monier-Faugere M-C, Herberth J. Bone disease after renal transplantation. *Nature Reviews Nephrology* 2010; 6: 32.
75. Cunningham J. Posttransplantation Bone Disease. *Transplantation* 2005; 79: 629.
76. Kneissel M, Luong-Nguyen N-H, Baptist M et al. Everolimus suppresses cancellous bone loss, bone resorption, and cathepsin K expression by osteoclasts. *Bone* 2004; 35: 1144.

77. Bacchetta J, Lafage-Proust M-H, Chapurlat R. Métabolisme phosphocalcique et osseux chez le patient transplanté rénal. *Néphrologie & Thérapeutique* 2013; 9: 461.
78. Uhlig K, Berns JS, Kestenbaum B et al. KDOQI US Commentary on the 2009 KDIGO Clinical Practice Guideline for the Diagnosis, Evaluation, and Treatment of CKD-MBD. *American Journal of Kidney Diseases* 2010; 55: 773.
79. Alshayeb HM, Josephson MA, Sprague SM. CKD–Mineral and Bone Disorder Management in Kidney Transplant Recipients. *American Journal of Kidney Diseases* 2013; 61: 310.
80. Gagnon R, Gallimore B. Characterization of a mouse model of chronic uremia. *Urological research* 1988; 16: 119.
81. Massy ZA. Uremia Accelerates both Atherosclerosis and Arterial Calcification in Apolipoprotein E Knockout Mice. *Journal of the American Society of Nephrology* 2004; 16: 109.
82. Sehayek E, Shefer S, Nguyen LB, Ono JG, Merkel M, Breslow JL. Apolipoprotein E regulates dietary cholesterol absorption and biliary cholesterol excretion: studies in C57BL/6 apolipoprotein E knockout mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2000; 97: 3433.
83. Meir KS. Atherosclerosis in the Apolipoprotein E-Deficient Mouse: A Decade of Progress. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2004; 24: 1006.
84. Bro S. Chronic Renal Failure Accelerates Atherogenesis in Apolipoprotein E-Deficient Mice. *Journal of the American Society of Nephrology* 2003; 14: 2466.
85. Buzello M. The Apolipoprotein E Knockout Mouse: A Model Documenting Accelerated Atherogenesis In Uremia. *Journal of the American Society of Nephrology* 2003; 14: 311.
86. Nikolov IG, Joki N, Nguyen-Khoa T et al. Chronic kidney disease bone and mineral disorder (CKD–MBD) in apolipoprotein E-deficient mice with chronic renal failure. *Bone* 2010; 47: 156.
87. Huang MS, Lu J, Ivanov Y et al. Hyperlipidemia Impairs Osteoanabolic Effects of PTH. *Journal of Bone and Mineral Research* 2008; 23: 1672.
88. Einhorn TA, Gerstenfeld LC. Fracture healing: mechanisms and interventions. *Nature Reviews Rheumatology* 2014; 11: 45.
89. Histing T, Garcia P, Holstein JH et al. Small animal bone healing models: Standards, tips, and pitfalls results of a consensus meeting. *Bone* 2011; 49: 591.

90. Monfoulet L, Rabier B, Chassande O, Fricain J-C. Drilled Hole Defects in Mouse Femur as Models of Intramembranous Cortical and Cancellous Bone Regeneration. *Calcified Tissue International* 2009; 86: 72.
91. Shapiro F. Bone development and its relation to fracture repair. The role of mesenchymal osteoblasts and surface osteoblasts. *Eur Cell Mater* 2008; 15: e76.
92. Schilling AF, Schinke T, Münch C et al. Increased Bone Formation in Mice Lacking Apolipoprotein E. *Journal of Bone and Mineral Research* 2004; 20: 274.
93. Neve A, Corrado A, Cantatore FP. Osteocalcin: Skeletal and extra-skeletal effects. *Journal of Cellular Physiology* 2013; 228: 1149.
94. Baitsch D, Bock HH, Engel T et al. Apolipoprotein E Induces Antiinflammatory Phenotype in Macrophages. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2011; 31: 1160.

## RESUME :

Les troubles du métabolisme minéral et osseux associés à la maladie rénale chronique (TMO-MRC) sont à l'origine de perturbation de la microarchitecture et de la solidité osseuse. La fréquence des fractures est particulièrement importante dans la population de patients suivis pour une insuffisance rénale chronique ; elles sont associées à une morbidité et une mortalité conséquentes. Les souris invalidées pour le gène de l'apolipoprotéine E (ApoE<sup>-/-</sup>), et rendues insuffisantes rénales développent des calcifications vasculaires et des perturbations du remodelage osseux, de la minéralisation, et du volume osseux comparables à celles observées chez les patients insuffisants rénaux chroniques.

L'objectif de notre étude était d'étudier les modalités de réparation osseuse dans un modèle de TMO-MRC, à travers l'analyse de la microarchitecture de l'os nouvellement formé chez la souris ApoE<sup>-/-</sup> urémique et contrôle et la souris C57BL6 urémique et contrôle.

Nous avons utilisé un modèle chirurgical d'IRC sur des souris C57BL6 et ApoE<sup>-/-</sup> femelles âgées de 8 semaines. Trois semaines après la dernière opération, des lésions osseuses de 1mm de diamètre étaient créés dans le condyle fémoral, selon un protocole élaboré dans le laboratoire. L'analyse du tissu osseux nouvellement formé était réalisée à 2 et 4 semaines de réparation, par microtomographie haute résolution à rayons X et analyse histologique.

L'analyse histologique et microtomographique du tissu osseux réparé a permis de mettre en évidence une augmentation du volume de tissu spongieux réparé dans le groupe ApoE<sup>-/-</sup> IRC, en lien avec des modifications architecturales : diminution de l'espacement entre les travées, tendance à une augmentation du nombre de travées. L'épaisseur des travées était plus importante dans le groupe ApoE<sup>-/-</sup> IRC en comparaison au groupe C57BL6 IRC. Ces observations sont compatibles avec le développement d'une ostéodystrophie à haut niveau de remodelage, comme observé dans l'ostéite fibreuse. La cinétique de réparation n'était pas différente entre les quatre groupes.

En conclusion, l'insuffisance rénale chronique modifie la réparation de l'os trabéculaire chez les souris ApoE<sup>-/-</sup>, et conduit à la formation d'un tissu osseux volumineux, compatible avec un haut niveau de remodelage.

---

DISCIPLINE : NEPHROLOGIE

---

MOTS-CLES : Réparation osseuse, Maladie rénale chronique, Troubles du métabolisme minéral et osseux associés à la maladie rénale chronique, Apolipoprotéine E.

---

INTITULE ET ADRESSE DU LABORATOIRE :

Unité INSERM U1026 BioTis, Université de Bordeaux,  
146 rue Léo-Saignat, 33076 BORDEAUX