



ANNEE:2017

THESE N° 09/17 CSVS

Centre d'Etudes Doctorales des Sciences de la Vie et de la Santé
Biologie médicale, pathologie humaine et expérimentale et environnement

THESE DE DOCTORAT

Contribution à l'étude de l'effet thérapeutique du mil à chandelle
«*Pennisetum glaucum L.*» dans la fragilité osseuse chez le rat wistar

Malika BARKIYOU

Présentée et soutenue le 20 Juillet 2017

JURY :

Professeur Taoufiq DAKKAPrésident

Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat, Université Mohammed V- Rabat

Professeur Omar CHOKAIRIDirecteur de thèse

Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat, Université Mohammed V- Rabat

Professeur Fathallah TIYAL.....Rapporteur

Faculté des sciences de Kénitra, Université Ibn Tofail – Kénitra

Professeur Ahmed ZAHIDI.....Rapporteur

Faculté de médecine et de pharmacie de Rabat, Université Mohammed V- Rabat

Professeur Saadia ABOUDRARExamineur

Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat, Université Mohammed V- Rabat

Professeur Taoufiq HARMOUCH Examineur

Faculté de Médecine et de Pharmacie de Fès, Université Mohammed Ben Abdallah - Fès

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

Remerciements

Les quelques mots exprimés dans cette page ne suffiront pas pour vous exprimer chers collègues toute ma reconnaissance et ma gratitude.

Mes remerciements les plus sincères vont à :

Monsieur le Professeur Taoufiq Dakka vice Doyen chargé de la recherche scientifique et de la coopération, Président du jury qui m'a encouragée et soutenue depuis toujours.

C'est un honneur pour moi de vous voir présider le jury de cette thèse.

Monsieur le Professeur Fathallah Tiyal

C'est un honneur pour moi que vous ayez accepté de siéger parmi les membres du jury de ma thèse en tant que rapporteur et juge malgré vos nombreuses responsabilités.

Monsieur le Professeur Ahmed Zahidi

Madame le Professeur Saadia Abouddrar

Monsieur le Professeur Taoufiq Harmouch

Je tiens à vous témoigner toute ma gratitude pour avoir accepté de juger ce travail. J'apprécie beaucoup votre aide, votre soutien et votre grande amabilité

Monsieur le Professeur Omar Chokairi Directeur de thèse

Ce projet n'aurait été pas possible sans votre appui, votre soutien vos conseils et votre disponibilité sans pareils. Je vous en remercie.

Monsieur le professeur Jamal Taoufiq Vice doyen chargé de la pharmacie et Directeur du centre d'Etudes Doctorales des sciences de la vie et de la santé à la Faculté de médecine et de pharmacie de Rabat.

Je tiens à vous exprimer mes sincères remerciements et ma reconnaissance pour m'avoir toujours accueillie avec beaucoup de sympathie et de bienveillance.

Monsieur le Professeur Mohammed Oulad Bouyahya Idrissi , qui n'a cessé de m'encourager et de me soutenir. Je tiens à vous remercier pour votre aide, vos conseils et votre générosité.

Dédicaces

A la mémoire de ma mère que dieu ait son âme.

Cela fera bientôt un an que tu nous as quittés, ta grandeur d'esprit et ta sagesse ont été et resteront pour toujours une lueur qui éclairera nos chemins.

Ton souvenir restera à jamais gravé dans nos cœurs et dans nos mémoires.

A la mémoire de mon défunt père que Dieu l'ait en sa sainte miséricorde

Puisse Dieu le miséricordieux vous accueillir en son vaste paradis.

A mes enfants Hajar et Amine, vous êtes et resterez toujours ma grande fierté.

Puisse Dieu vous protéger et vous guider.

A mon époux. Merci pour ton soutien infailible, ta gentillesse et ton amabilité.

A toute ma famille, mes amis et mes chers étudiants.

Tables des matières

REMERCIEMENTS	2
DEDICACES	3
TABLE DES MATIERES	6
LISTE DES FIGURES	8
LISTE DES TABLEAUX	8
ABREVIATIONS	9
AVANT PROPOS.....	11
PREMIERE PARTIE : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	16
CHAPITRE 1 : LE TISSU OSSEUX.....	19
1. Développement embryonnaire du tissu osseux	16
2. Histologie du tissu osseux	19
2.1 La matrice du tissu osseux.....	19
2.2 Les cellules osseuses	20
2.2.1 La lignée ostéoclastique	21
2.2.1 La lignée ostéoblastique	21
2.2.2 Les ostéocytes.....	22
2.2.3 Les cellules bordantes.....	22
2.2.5 Prolifération et différenciation de la lignée ostéoblastique... ..	23
3. Organisation du tissu osseux	25
4. Remodelage du tissu osseux.....	29
4.1 Phases du remodelage osseux	29
4.2 Contrôle du remodelage osseux	31
4.2.1Facteurs locaux	31
4.2.2 Rôle des hormones	34
5. Capital osseux et perte osseuse.....	39
6. L'os peut se réparer spontanément après une fracture	40
CHAPITRE II : FRAGILITE OSSEUSE ET OSTEOPOROSE	41
1. Définitions	41
2. Epidémiologie.....	42
3. Physiopathologie	43
3.1 Dans les ostéoporoses primitives et post ménopausiques	43
3.2 Dans les ostéoporoses secondaires	46

4. Anatomie pathologique et génétique	47
5. Etiologies	49
5.1 Ostéoporoses primitives	49
5.2 Ostéoporoses juvéniles	50
5.2.1 L'ostéoporose imparfaite	50
5.2.2 L'ostéoporose juvénile idiopathique	50
5.3 Ostéoporoses secondaires	51
6. Corticothérapie et ostéoporose	52
7. Obésité et ostéoporose	53
8. Foie et os.....	54
9. Rein, glandes salivaires et os.....	55
10. Traitement et prévention de la fragilité osseuse	57
10.1 Les mesures hygiéno-diététiques.....	57
10.2 Fournir des éléments constitutifs en quantité suffisante	57
10.3 Fournir des nutriments / micronutriments potentiellement protecteurs	59
10.4 Le traitement médical.....	62
10.4.1 Traitement antirésorptif	62
10.4.2 Traitement ostéoformateur	63
10.4.3 Découplants positifs	63
CHAPITRE III : LE MIL A CHANDELLE «<i>Pennisetum glaucum</i>(L.) ».....	65
1. Taxonomie du mil à chandelle.....	65
2. Morphologie.....	67
3.1. Composition chimique.....	67
3.2. Activités biologiques.....	70
DEUXIEME PARTIE : ETUDE EXPERIMENTALE	72
INTRODUCTION	73
CHAPITRE I : Effet de l'extrait aqueux du mil à chandelle versus alendronate sur les mandibules et les glandes salivaires de rats soumis au régime cafétéria associé à des corticostéroïdes.....	74
CHAPITRE II : Comparaison sur les plans biochimiques et histologiques de l'effet de <i>Pennisetum glaucum</i> L et de l'alendronate sur les vertèbres lombaires et le foie de rats alimentés par un régime cafétéria associé à un traitement glucocorticoïde	76
CONCLUSION GENERALE	78
ADDITIF : Extraction et caractérisation simplifiées du collagène de type I solubilisé dans l'acide acétique de la peau de <i>Solea Solea</i> et des queues de rat Wistar pour des applications biomédicales et biotechnologiques.....	80
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	82

Liste des figures

Figure 1 : Ossification membraneuse	17
Figures 2 et 3 : Schéma des différentes couches du cartilage de croissance.....	18
Figures 4 et 5 : Etapes de l'ossification enchondrale	20
Figure 6 : Les cellules du tissu osseux	21
Figure 7 : Ostéoclastogénèse	23
Figure 8 : Différenciation des cellules de la lignée ostéoblastique	25
Figure 9 : Voie de signalisation Wnt/b-caténine	25
Figure 10 : Différentes portions anatomiques d'un os long	25
Figure 11 : Variétés histologiques d'os	25
Figure 12 : Organisation de l'os compact	27
Figure 13 : Os compact montrant des ostéones avec canaux de Havers	27
les ostéocytes et les lamelles osseuses microscopie électronique	
Figure 14 : Tissu compact haversien Configuration 3 D d'os compact	28
Figure 15 : Os spongieux : travées osseuses , moelle hématogène	29
Figure 16 : Les 3 phases du remodelage osseux	30
Figure 17 : Zone de résorption par l'ostéoclaste	30
Figure 18 : Les phases du remodelage osseux	31
Figure 19 : Mécanismes moléculaires du remodelage osseux	32
Figure 20 : Régulation de la sécrétion de RANKL et de l'OPG par les ostéoblastes.....	34
Figure 21 : Régulation de la calcémie par la parathormone et la calcémie.....	35
Figure 22 : Synthèse et métabolisme de la vitamine D	37
Figure 23 : Contrôle de l'homéostasie la masse osseuse	39
Figure 24 : Capital osseux et risque fracturaire.....	40
Figure 25 : Estimation du risque de fractures d'ostéoporose	42
Figure 26 : Evolution de la masse osseuse en fonction de l'âge	43

Figure 27 : Microscanner du radius.....	47
Figure 28 : Structure en microscopie électronique de biopsies d'ostéoporose	48
Figure 29 : Physiopathologie de l'ostéoporose cortisonique	53
Figure 30 : Physiopathologie de l'ostéodystrophie rénale	56
Figure 31 : Polyphénols dans l'alimentation.....	61
Figure 32 : Relations entre aliments et métabolisme osseux	62
Figure 33 : Culture du mil à chandelle	67

Liste des tableaux

Tableau 1 : Facteurs de risque de l'ostéoporose idiopathique.....	46
Tableau 2 : Principales étiologies de l'ostéoporose secondaire.....	51
Tableau 3 : Contenu en phytoestrogènes de plantes de fruits et de graines	59
Tableau 4 : Taxonomie de « Pennisetum glaucum L ».	66
Tableau 5 : Composition chimique des grains du mil à chandelle.	68
Tableau 6 : Analyse de la composition approximative du millet marocain	69
Tableau 7 : composition en acides gras de l'huile du millet marocain	70

Abréviations

AEPG : extrait aqueux du *Penisetum glaucum* (mil à chandelle)

ALN : Alendronate

AML : acidose métabolique latente

BMP : bonemorphogeneticprotein;

BMU : unité fonctionnelle de remodelage

CaBP : calcium binding proteins

CaSR : récepteur sensible au calcium

CC : cartilage calcifié

CFU-M : ColonyFormingUnit Macrophage

C/EBP : CCAAT-Enhancer-Binding Protein

DMO : densité minérale osseuse

DBP : D binding protein

Dkk ou Kremen : Dickkopf protéines membranaires

DMP-1:Dentin matrix acidic phosphoprotein

F : formation

PU-1, c-fos, NFκB : facteurs de transcription

FGF: fibroblast growth factor;

FGF23 : fibroblast growth factor 23

FGFR1 : récepteur du FGF23

Frz : *Frizzled* ;

GC : glucocorticoïdes

HPT II : hyperparathyroïdie secondaire

IGF: insulin growth factor;

IGFBP-2 :*Insulin-like Growth Factor-Binding Protein*

IL-1 : interleukine 1

IMC : indice de masse corporelle

IRC : insuffisance rénale chronique

GMCSF: *Granulocyte Macrophage Stimulating Factor*

KDIGO: *Kidney Disease Improving Global Outcomes*

LB : os lamellaire

LRP5 ou 6 : *LDL related protein 5* ou 6

MEC : matrice extracellulaire;

MEF2 : *Myocyte-Enhancer Factor 2*

MEPE : Matrix extracellular phosphoglycoprotein

MRF :*Myogenic Regulatory Factors*

MSC : précurseur mésenchymateux situé dans la moelle osseuse

M-CSF: macrophage colony stimulating factor;

MRC : maladies rénales chroniques

ODR : ostéodystrophie rénale

OMS, WHO : Organisation Mondiale de la Santé

OPG: ostéoprotégérine

OSE : *Osteoblast Specific cis-acting Element 2*

OI : ostéogénèses imparfaites

Osx : *Ostérix*
PDGF ; Platelet-derived growth factor
PGE2: Prostaglandin E2
PPAR: Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma
PTH: parathormone
R: résorption
RANK : receptor activator of nuclear factor kappa B
RANKL : receptor activator of nuclear factor kappa B ligand
Rev : inversion
Runx2: Runt-related transcription factor 2, encore appelé Core-binding factor ou Cbfa1
SHGB: *Sex Hormone Binding Globulin*
Sox : Sry Related HMG box
SOST : la sclérostine
TD : tube digestif
TGF : transforming growth factor;
TMO-MRC : “Troubles Minéraux et Osseux de la Maladie Rénale Chronique
TNFa: tumor necrosis factor alpha;
VDR : receptor vitaminique D
VEGF : Vascular endothelial growth factor,
WB : os tissé
Wnt : wingless integration

Avant - propos

Depuis que l'homme existe sur terre, la médecine traditionnelle l'a accompagné, il l'a enrichie et diversifiée au fil des âges. Elle guérit, prévient le mal, reconforte parfois et donne des espoirs dont les hommes ont souvent besoin devant la faillite de la médecine moderne.

Elle émane des prescriptions religieuses ou simplement de pratiques ancestrales. Celles-ci peuvent sembler dénuées de fondements tels que nous les concevons de nos jours. Mais, pouvons nous effacer d'un revers de la main une expérience humaine séculaire fondée sur l'observation de la vie, la symbiose avec la nature et l'intelligence cumulée de l'humanité à travers les âges et les temps ?

L'OMS, définit la médecine traditionnelle comme « des pratiques, méthodes, savoirs et croyances en matière de santé qui impliquent l'usage à des fins médicales de plantes, de parties d'animaux et de minéraux, de thérapies spirituelles, de techniques et d'exercices manuels – séparément ou en association – pour soigner, diagnostiquer et prévenir les maladies ou préserver la santé »(1).

De nos jours où la terre est en souffrance, la médecine traditionnelle, s'inscrit dans une logique de développement durable en préservant la biodiversité et l'harmonie entre l'humain et son environnement. Dans nos pays, la médecine traditionnelle est bien ancrée dans les pratiques et les mentalités. En occident, les adaptations de la médecine traditionnelle sont nommées « complémentaires », « alternatives », « non conventionnelles », ou encore « parallèles ».

Les plantes sont utilisées en médecine traditionnelle dans le monde entier sous tous les climats et les reliefs, elles constituent le substratum de la plupart des médicaments et des drogues. Malgré le développement fabuleux qu'a connu la médecine moderne, la thérapeutique par les plantes médicinales traditionnelle reste présente et connaît actuellement un essor extraordinaire à l'heure du retour à l'authenticité et à la nature. L'OMS reconnaît d'ailleurs la médecine traditionnelle comme un des éléments essentiels des soins de santé primaire : « sauver les plantes qui sauvent la vie » tel est le slogan qui résumerait la stratégie de l'OMS dans ce domaine(1).

Les plantes médicinales de par leur large éventail et leur grande richesse, constituent le volet dominant de la médecine traditionnelle.

Parmi les bienfaits des plantes leurs propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires ont un rôle fondamental dans l'immunocompétence (2). La longévité rapportée concernant le régime méditerranéen est due aux propriétés reconnues du mode de vie et de l'alimentation naturelle et simple qui permet de lutter contre les radicaux libres. La distribution géographique mondiale différentielle de l'incidence de l'ostéoporose, est à l'origine de l'hypothèse du rôle protecteur des phytoestrogènes. L'incidence peu élevée de cette pathologie dans les pays asiatiques est imputée à la forte consommation de produits dérivés du soja qui n'est autre qu'une phytoestrogène(2)

Cependant, les facteurs prédictifs d'utilisation des plantes médicinales et aromatiques sont peu étudiés.

Dans notre pays et dans bien d'autres, le mil à chandelle « une graine » est utilisée de génération en génération pour traiter et prévenir la fragilité osseuse et les fractures. Un large champ d'investigations est à entreprendre pour découvrir et exploiter les vertus de cette graine. Des travaux réalisés ont déjà mis en évidence une activité anti-inflammatoire et antioxydante (3). D'autres travaux deviennent indispensables afin d'étudier les aspects positifs mais aussi négatifs de ces plantes. Notre travail s'inscrit dans ce même ordre.

Dans un but didactique, nous avons divisé notre travail en deux parties :

La première partie correspond à une revue de la bibliographie, dans la deuxième partie nous rapportons les résultats et les publications de notre étude expérimentale.

Dans la première partie, chapitre I, nous avons abordé la structure et la physiologie osseuse qui sont les préliminaires indispensables à la compréhension de la fragilité osseuse.

Quelle ne fut notre surprise de découvrir combien la physiologie osseuse et les mécanismes de contrôle intracellulaires ont évolué, nous sommes maintenant dans le monde moléculaire. Les données nouvelles nous font appréhender, la médecine de demain avec de nouvelles molécules fruit du génie génétique et de la recherche en biologie moléculaire. Grâce à cela la thérapeutique devient ciblée et personnalisée

Nous avons appris dans cette recherche bibliographique que le remodelage osseux est sous le contrôle de nombreuses molécules qui agissent de concert avec l'action de facteurs hormonaux. Le phénomène de remodelage se déroule pendant toute la vie de l'individu, ce qui fait de l'os un tissu vivant par excellence qui participe à l'homéostasie du milieu intérieur de façon constante. Les dérèglements qui affectent ces processus représentent le *primum movens* de la fragilité osseuse avec toutes ses conséquences désastreuses

Dans le deuxième chapitre de notre travail, nous nous sommes intéressées à la fragilité osseuse dans ses aspects épidémiologiques, physiopathologiques, histopathologiques étiologiques et thérapeutiques. Il ressort de notre revue de la littérature que l'étiologie principale de la fragilité osseuse est représentée surtout par l'ostéoporose. Le traitement et la prévention que l'on peut proposer par le mil à chandelle trouve sa justification la plus plausible dans ce type de pathologie.

Dans ce chapitre, nous avons abordé les différents traitements habituels et à venir de la fragilité osseuse, en mettant en exergue bien entendu la place de choix des traitements « parallèles » qui se justifient comme nous l'avons signalé auparavant sur les plans épidémiologiques et scientifiques (2, 3)

Le troisième chapitre a été consacré à rapporter les données de la littérature concernant le mil à chandelle que nous proposons comme traitement et prévention de la fragilité osseuse. Dans cette partie de notre revue nous avons constaté l'abondance des données en ce qui concerne les paramètres géographiques de la répartition de cette plante, ses caractéristiques physicochimiques et botaniques, sa valeur nutritive et les investigations génétiques pour améliorer son rendement et sa résistance. Notre déception a été grande quand nous avons noté l'absence de données concernant l'intérêt de cette plante en tant que plante médicinale. Les seules semblent donc appartenir à la tradition orale et aux pratiques culturelles. Ceci incite nos chercheurs à l'instar de ce qui a été réalisé (3) à s'intéresser de plus près aux propriétés thérapeutiques de cette plante, contribuer à l'élaboration de normes internationales pour sa prescription comme plante médicinale et lutter contre la biopiraterie.

Dans la deuxième partie de notre travail nous exposons les travaux expérimentaux que nous avons réalisés avec l'équipe du laboratoire de biologie histologie embryologie et cytogénétique de la Faculté de médecine et de pharmacie de Rabat.

Dans ce cadre là, un des axes de recherche consiste à explorer sur les plans biologique et histologique les effets curatifs, mais aussi préventifs et délétères des plantes médicinales.

Notre choix s'est porté sur le mil à chandelle du fait de sa large réputation dans le traitement de la fragilité osseuse. La fragilité osseuse et ses conséquences représentent un véritable problème de santé publique avec le vieillissement de la population. Plusieurs alternatives s'offrent pour faire face à ce fléau qui devient sociétal. Le moyen le plus adéquat est la prévention avec une hygiène de vie et l'utilisation des moyens naturels. La médecine traditionnelle en s'appropriant des matériaux puisés de la nature même en est l'une des meilleures voies. L'utilisation du mil à chandelle est ancrée dans les us et les coutumes en milieu marocain. Cette plante aux innombrables vertus serait selon la tradition orale un excellent remède contre la fragilité osseuse et l'ostéoporose. Partant de là nous nous sommes intéressés au rôle que jouerait cette graine pour traiter et prévenir la fragilité osseuse chez le rat wistar en utilisant différents protocoles et en comparant les effets du mil à une drogue « l'alendronate » utilisée dans le traitement de la fragilité osseuse (4).

Partie I: Etude bibliographique

Chapitre I : Le tissu osseux

Le tissu osseux est un tissu conjonctif spécialisé. Il est fait de cellules et d'une matrice extra cellulaire (MEC). Ce tissu est caractérisé par la nature solide, dure et calcifiée de sa MEC.

Il existe 3 variétés anatomiques de l'os : les os longs (comme le tibia, le fémur...), courts (comme les os du carpe) et plats (comme le sternum, les côtes...).

Les os constituent la charpente osseuse (squelette), ils assurent une triple fonction :

1) **Fonction mécanique** : le tissu osseux est un des tissus les plus résistants de l'organisme, capable de supporter des contraintes mécaniques, ce qui donne à l'os son rôle de soutien du corps et de protection des organes.

2) **Fonction métabolique** : C'est un tissu dynamique, constamment remodelé sous l'effet des pressions mécaniques, entraînant la libération ou le stockage de sels minéraux, et assurant ainsi dans une large mesure (conjointement avec l'intestin et les reins) le contrôle du métabolisme phosphocalcique. C'est un tissu vivant intégré dans l'homéostasie générale.

3) **Fonction hématopoïétique** : les os renferment dans leurs espaces médullaires, la moelle osseuse hématopoïétique. Les cellules stromales de la moelle osseuse fournissent un support structural et fonctionnel aux cellules hématopoïétiques. Certaines d'entre elles sont des cellules-souches multipotentes susceptibles de se différencier dans de multiples lignages différents (fibroblastes, chondrocytes, ostéoblastes, adipocytes...).

Pour assurer ces fonctions, le tissu osseux est en perpétuel renouvellement sous l'influence de facteurs hormonaux et locaux. Ce sont les altérations de ces voies de contrôle du remodelage osseux qui aboutissent à la plupart des pathologies du tissu osseux (5)

1. Le développement Embryonnaire du tissu osseux

La formation du tissu osseux débute vers la 9^e semaine du développement embryonnaire. Elle se fait à partir mésoblaste de deux façons selon les territoires : l'ossification endomembraneuse et l'ossification endochondrale ou enchondrale.

L'ossification endomembraneuse est celle des os de la voûte crânienne et du maxillaire ; elle a une origine mésenchymateuse(6).

L'ossification endochondrale est celle des os longs, des vertèbres, des os du pelvis et de la base du crâne, elle se fait à partir du cartilage qui se solidifie avec la croissance. (6)

Ossification membraneuse

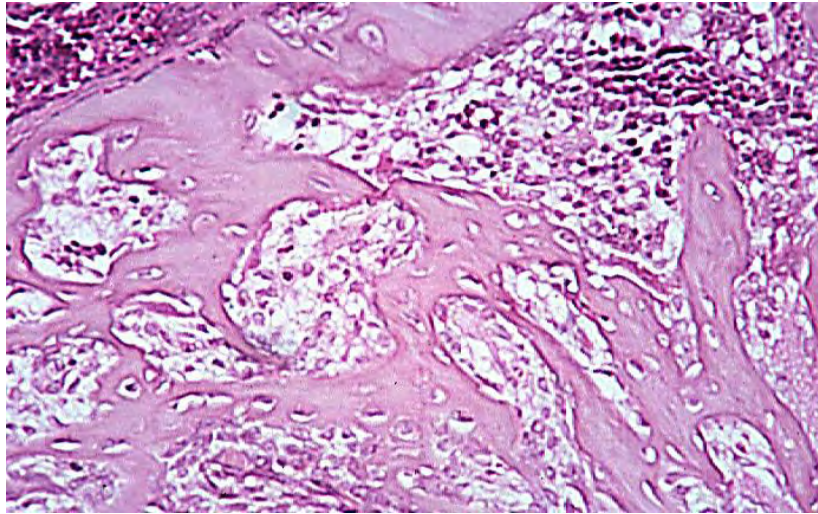
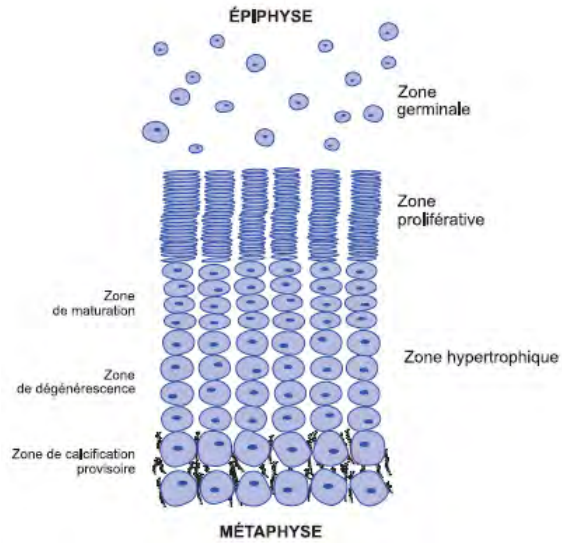
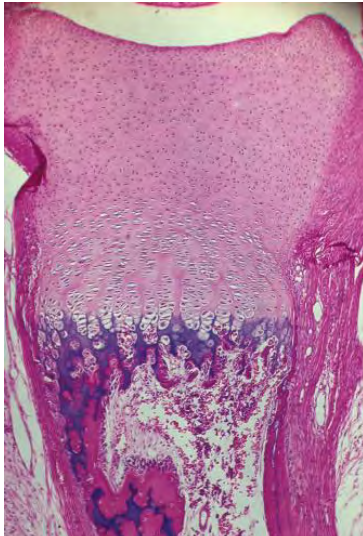


figure1 : Ossification membraneuse (7)

Des cellules mésenchymateuses se différencient en ostéoblastes (figure1). La substance fondamentale du tissu conjonctif se modifie et forme alors un réseau de travées denses. Les ostéoblastes s'appliquent contre ces travées et élaborent des lamelles osseuses.

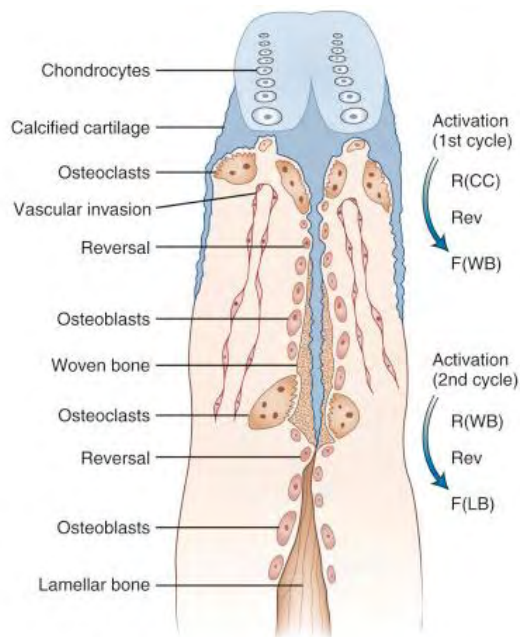
Ossification endochondrale : transformation en deux cycles du cartilage en tissu osseux. Le cartilage hyalin devient le support d'une ossification endochondrale au cours de l'élaboration et de la croissance d'un os long. Les chondrocytes, s'hypertrophient, sécrètent des phosphatases alcalines qui déclenchent la calcification de la matrice extracellulaire, et dégènèrent. Ceci aboutit à la formation de logettes vides séparées par des travées calcifiées. Ces logettes sont envahies par des vaisseaux accompagnés de cellules mésenchymateuses qui prennent appui sur les travées calcifiées et se transforment en ostéoblastes.(6)



Figures 2 et 3 : Schéma des différentes couches du cartilage de croissance (7,8)

La zone germinale contient quelques chondrocytes sphériques, séparés par une matrice extracellulaire abondante.

La zone proliférative se caractérise par un aplatissement et une prolifération des chondrocytes (Figures 2 et 3) qui s'agencent en colonnes longitudinales. Dans la zone hypertrophique, les chondrocytes augmentent progressivement de taille et deviennent à nouveau sphériques. Dans la zone de calcification provisoire on observe les débuts de l'ossification définitive (Figures 4 et 5).



Figures 4 et 5 : Etapes de l'ossification enchondrale: CC, cartilage calcifié; F formation; LB os lamellaire; R, résorption; Rev, inversion; WB, os tissé 2 cycles : 1^{er} cycle transformation CC en WB, 2^{ème} cycle transformation WB en LB (7,9)

2. Histologie du tissu osseux

Le tissu osseux est un tissu de soutien conjonctif spécialisé. Il est fait de cellules et d'une matrice extra cellulaire (MEC).

Le tissu osseux contient 65-70 % de substance minérale et 30–35 % de matrice organique (10)

2.1. La matrice extra cellulaire

La MEC du tissu osseux est calcifiée, elle comporte une partie organique et une phase minérale.

Fraction organique

La MEC organique est composée de microfibrilles de collagène (90 %), les 10 % restants correspondant à des protéines non collagéniques : protéoglycane, ostéopontine (reliant l'hydroxy-apatite aux cellules osseuses), ostéonectine (intervenant dans la minéralisation par son affinité pour le collagène I et le calcium), ostéocalcine (marqueur des ostéoblastes matures, intervenant dans la minéralisation), sialoprotéine osseuse et de thrombospondine (permettant l'attache des cellules osseuses à la MEC via un récepteur membranaire de la famille des intégrines). Ces constituants sont synthétisés par les ostéoblastes. La MEC osseuse contient des cytokines et des facteurs de croissance sécrétés par les ostéoblastes et jouant un rôle fondamental dans la régulation du remodelage du tissu osseux et de la minéralisation de la MEC osseuse (10)

Fraction minérale

Elle est constituée de cristaux d'hydroxy-apatite (phosphate de calcium cristallisé) et de carbonate de calcium. Ces cristaux sont visibles en microscopie électronique entre les fibres de collagène et/ou à l'intérieur de celles-ci, sous la forme de petites aiguilles hexagonales, denses aux électrons. Les ions Ca^{++} et PO_4^{3-} situés en surface des cristaux participent à des échanges rapides avec le liquide interstitiel et donc avec le courant sanguin. L'os, qui contient 98 % du calcium de l'organisme, représente un réservoir de calcium et joue un rôle primordial dans le métabolisme phosphocalcique. La minéralisation de la MEC osseuse rend compte de la dureté de l'os. (10)

2.2. Les cellules osseuses

Le tissu osseux contient 4 types de cellules (10) :

- les cellules de la lignée ostéoclastique qui résorbent l'os : les ostéoclastes ;
- les cellules de la lignée ostéoblastique qui sont ostéoformatrices : les ostéoblastes, les ostéocytes et les cellules bordantes.

Les ostéoblastes, les ostéoclastes et les cellules bordantes de l'os se trouvent à la surface des plages du tissu osseux, alors que les ostéocytes sont situés à l'intérieur de la matrice osseuse.

Contrairement aux cellules ostéoformatrices qui dérivent de cellules-souches mésenchymateuses pluripotentes, les ostéoclastes dérivent de la lignée hématopoïétique monocyttaire (cellule-souche hématopoïétique CFU-M) (Figure 6).

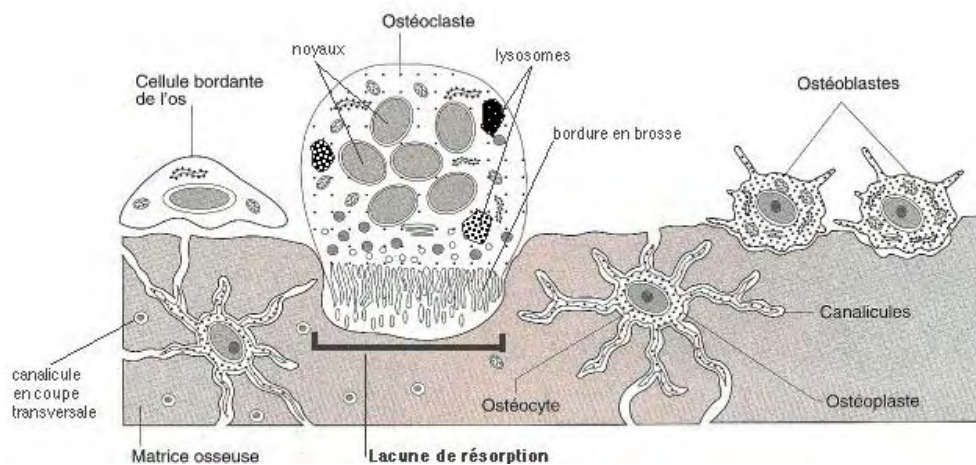


Figure 6 : Les cellules du tissu osseux(8)

1/ Lignée ostéoclastique

La lignée ostéoclastique dérive de précurseurs médullaires hématopoïétiques (CFU-M, *Colony Forming Unit Macrophage*) Ceux-ci se différencient en ostéoclastes sous l'influence de facteurs de transcription (PU-1, c-fos, NFκB) et de facteurs de croissance. Le M-CSF agit précocement dans la lignée. Les préostéoclastes mononucléés fusionnent pour former des ostéoclastes matures multinucléés (Figure 7) sous l'action principale du système RANK-RANKL [(5)

L'ostéoclaste est une cellule post mitotique, mature, géante et multinucléée de 20 à 100 μm de diamètre hautement mobile, (10) capable de se déplacer à la surface des travées osseuses d'un site de résorption à un autre. Son pôle basal présente une bordure en brosse, où siègent les phénomènes de résorption. Celle-ci débute par l'adhérence de l'ostéoclaste sur la travée osseuse.

L'ostéoclaste possède un équipement enzymatique important lui permettant :

- l'acidification et la dissolution de la phase minérale de la matrice osseuse par libération d'ions H^+ par une pompe à protons(11);
- la dissolution de la phase organique de la matrice osseuse (fibres collagènes et protéines non collagéniques) par des enzymes lysosomiales (cathepsine K et collagénases).

L'os résorbé laisse ainsi peu à peu place à une lacune de résorption, appelée lacune de Howship.

La durée de vie moyenne d'un ostéoclaste est de 2 semaines, après lesquelles il entre en apoptose.

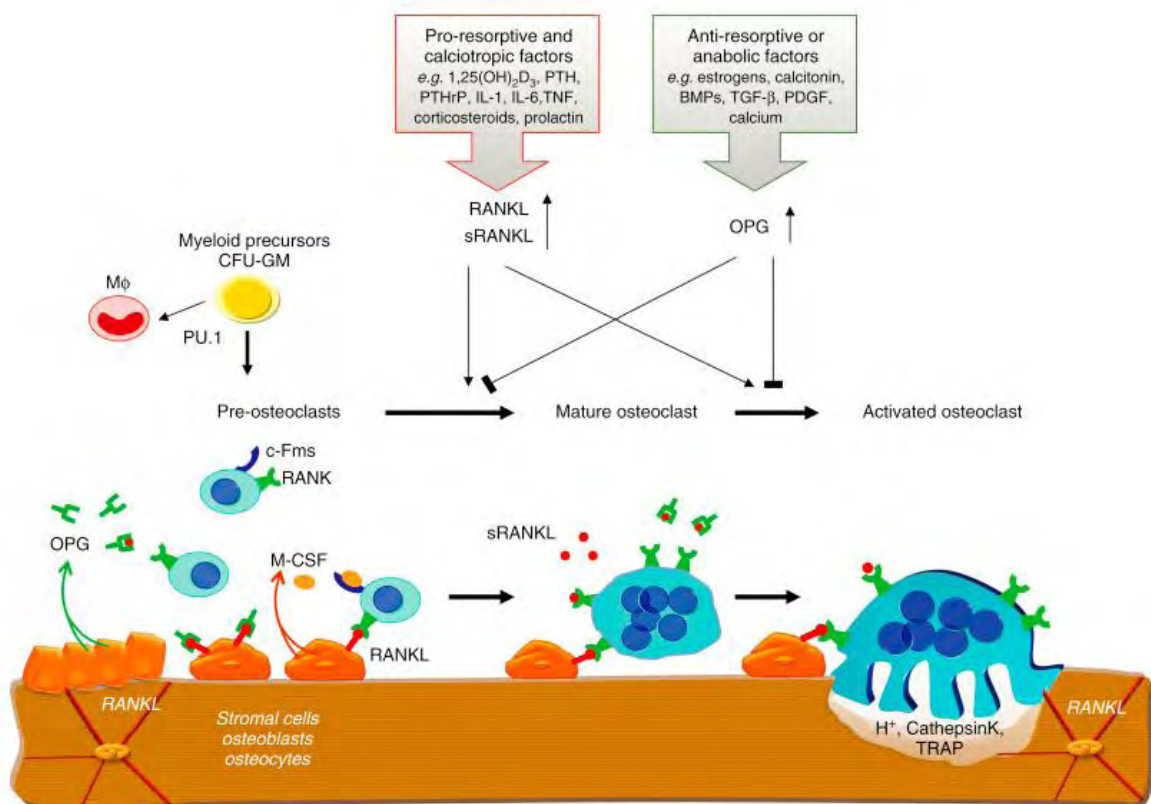


Figure 7 :Ostéoclastogénèse : facteurs activateurs et inhibiteurs (9)

Les ostéoclastes ont une origine commune avec les monocytes/macrophages dans la moelle osseuse. La différenciation en ostéoclaste se fait sous l'action des facteurs de transcription (PU-1, c-fos, NFκB, mi) et de facteurs de croissance (M-CSF et RANKL).

2/ Lignée ostéoblastique

Les ostéoblastes sont des cellules ostéoformatrices, mononucléées, cubiques situées à la surface externe et interne du tissu osseux en croissance. Elles sont reliées entre elles et avec les ostéocytes par des jonctions communicantes

Ces cellules élaborent un os nouveau après l'action des ostéoclastes. Leur cytoplasme est riche en organites impliqués dans la synthèse protéique (réticulum endoplasmique granulaire abondant, appareil de Golgi volumineux. Elles synthétisent donc les protéines qui composent le tissu ostéoïde (matrice non minéralisée, constituée de collagène de type 1 et de protéines non collagéniques).

Elles produisent également les enzymes (phosphatases alcalines) qui permettent le dépôt de cristaux d'hydroxyapatite, assurant ainsi la minéralisation de la matrice.

Le devenir des ostéoblastes peut se faire selon 3 voies : 1) transformation en ostéocytes en s'entourant complètement de MEC, 2) mise au repos sous la forme de cellules bordantes tapissant les surfaces osseuses ou 3) mort par apoptose.(8)

3/ Ostéocytes

Ils proviennent de la différenciation de certains ostéoblastes, incapables de se diviser, entièrement « emmurés » par la matrice extracellulaire osseuse minéralisée, au sein de logettes appelées ostéoplastes. Leur corps cellulaire est de plus petite taille que celui des ostéoblastes, fusiforme, possédant moins d'organites que les ostéoblastes. Elles possèdent de très nombreux prolongements cytoplasmiques qui cheminent au-delà de l'ostéoplaste à travers un réseau de canalicules creusés dans la matrice osseuse. Ces canalicules permettent de relier les ostéocytes entre eux et avec les cellules de la surface osseuse (ostéoblastes et cellules bordantes) par des jonctions communicantes. Plusieurs études ont montré que ces cellules, sensibles au stress mécanique et au mouvement des fluides, étaient capables de synthétiser certaines molécules en réponse à un stimulus mécanique, jouant ainsi un rôle dans les échanges calciques entre le tissu osseux et le sang(5,12). Les ostéocytes expriment aussi la sclérostine, puissant inhibiteur de la formation osseuse (13)

Les ostéocytes, avec des capacités de synthèse et de résorption limitées, participent au maintien de la matrice osseuse et contribuent à l'homéostasie de la calcémie.

4/ Cellules bordantes (lining cells)

Ce sont des ostéoblastes au repos susceptibles, sous sollicitation, de redevenir des ostéoblastes actifs. Ces cellules tapissent les surfaces osseuses qui ne sont soumises ni à la formation, ni à la résorption osseuse. Elles sont aplaties, reliées entre elles et avec les ostéocytes voisins par des jonctions communicantes

5/ Prolifération et différenciation au sein de la lignée ostéoblastique

La cellule souche de la lignée ostéoblastique est une cellule mésenchymateuse pluripotente indifférenciée du stroma médullaire. Cette cellule est généralement capable de se différencier en de nombreuses autres cellules matures telles que les adipocytes, les chondrocytes ou les cellules musculaires (Figure 8). L'activité des cellules ostéoblastiques est régulée par un contrôle réciproque de la prolifération et de la différenciation cellulaire.

Facteurs de transcription (5)

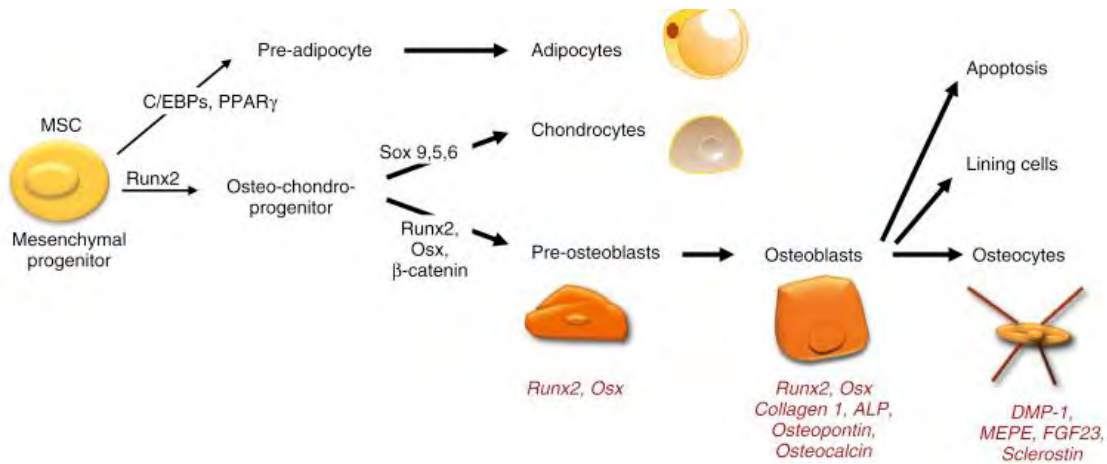


Figure 8 : Différenciation des cellules de la lignée ostéoblastique(9). Les ostéoblastes se différencient à partir d'un précurseur mésenchymateux situé dans la moelle osseuse (MSC), qui peut aussi se différencier en cellule musculaire squelettique, adipocyte, chondrocyte ou fibroblaste sous l'action de différents facteurs de transcription. MRF: *Myogenic Regulatory Factors* ; MEF2 : *Myocyte-Enhancer Factor 2* ; C/EBP : *CCAAT-Enhancer-Binding Protein* ; PPAR : *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma* ; Sox : *Sry Related HMG box* ; Runx2 : *Runt-related transcription factor 2* ; Osx : *Ostérix*. DMP-1: Dentin matrix acidic phosphoprotein ; MEPE : Matrix extracellular phosphoglycoprotein ; FGF23 : fibroblast growth factor 23

Parmi les facteurs régulant la différenciation préférentielle des cellules souches vers la voie ostéoblastique, le facteur de transcription Runx2 (*Runt-related transcription factor 2*, encore appelé *Core-binding factor* ou Cbfa1) joue un rôle majeur. Il reconnaît le site OSE (*Osteoblast Specific cis-acting Element 2*) présent notamment dans le promoteur de l'ostéocalcine. Les souris privées du facteur de transcription Runx2 ne présentent aucune ossification enchondrale ou membranaire, leur maturation chondrocytaire est altérée et leur nombre d'adipocytes est élevé (14).

Ostérix (Osx) est un autre facteur de transcription qui agirait en aval de Runx2, principalement sur la différenciation terminale des ostéoblastes, distinguant ainsi la voie ostéogénique de la voie chondrogénique (15).

Voie de signalisation Wnt (Figure 9):

La voie de signalisation Wnt/ β -caténine joue un rôle essentiel dans le contrôle de la formation osseuse. La liaison de la protéine Wnt à son récepteur transmembranaire (*frizzled*) et à son corécepteur (LRP-5 ou LRP-6) entraîne le passage d'une molécule, la β -caténine, dans le noyau de l'ostéoblaste (5). La β -caténine interagit alors avec le facteur de transcription TCF/LEF qui active la transcription des gènes conduisant à la stimulation de la formation ostéoblastique. En l'absence du ligand Wnt, la β -caténine est phosphorylée, ce qui conduit à sa dégradation par le protéasome. La voie Wnt est régulée négativement par plusieurs antagonistes. L'interaction de LRP5 avec des protéines membranaires telles que Dickkopf (Dkk) ou Kremen empêche sa liaison avec Wnt et induit sa dégradation. D'autres antagonistes extracellulaires tels que FRP et WIF-1, qui se lient à Wnt, ou la sclérostine qui se lie à LRP5/6, inhibent la voie Wnt.

La voie canonique Wnt/ β -caténine augmente la prolifération et la différenciation des cellules mésenchymateuses vers la voie ostéoblastique et diminue leur différenciation adipocytaire, ce qui favorise l'ostéogenèse. L'effet positif de la voie Wnt sur la différenciation ostéoblastique implique l'augmentation de Runx2 et d'Ostérix, alors que l'effet inhibiteur sur la différenciation adipocytaire implique une réduction des facteurs de transcription C/EBP α et de PPAR γ . Le rôle de la voie canonique Wnt dans le contrôle de la masse osseuse a été mis en évidence chez l'homme (16). Des mutations inactivatrices de LRP5 sont associées à une perte osseuse alors que des mutations activatrices, qui réduisent l'association avec l'inhibiteur Dkk, induisent une masse osseuse élevée. Enfin, des travaux génétiques ont montré que la perte de fonction de la sclérostine engendre la sclérostéose et la maladie de van Buchem, caractérisées par une augmentation de la masse osseuse.

Schématisation de la voie de signalisation Wnt

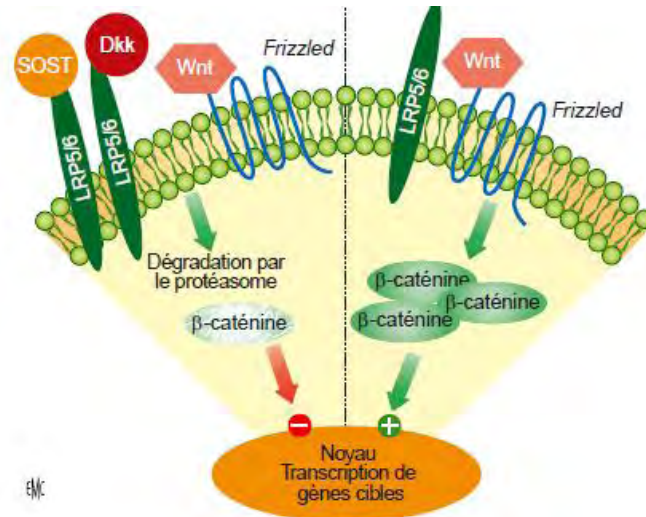


Figure 9 : Voie de signalisation Wnt/b-caténine. (17)

À l'état de base, la b-caténine est phosphorylée par le complexe GSK3/APC/Axin qui entraîne sa dégradation par le protéasome. La transduction du signal dans le noyau ne peut se faire. Lorsque la protéine Wnt couplée à son récepteur membranaire la protéine *Frizzled* (Frz) se lie au corécepteur LRP5 ou 6 (*LDLrelatedprotein5* ou 6), la phosphorylation de b-caténine par le complexe est inhibée, ce qui permet son passage dans le noyau et l'activation de la transcription de gènes cibles. Dkk1 et 2, la sclérostine (SOST) ou encore Kremen sont des inhibiteurs de cette voie qui empêchent la liaison de LRP5 au couple Wnt/Frz.

3. Organisation du tissu osseux

Les 3 variétés anatomiques de l'os (diaphyse, métaphyse, épiphyse) (figure 10) présentent une organisation histologique différente pour chacun des types : os lamellaire cortical et os trabéculaire (figure 11) .

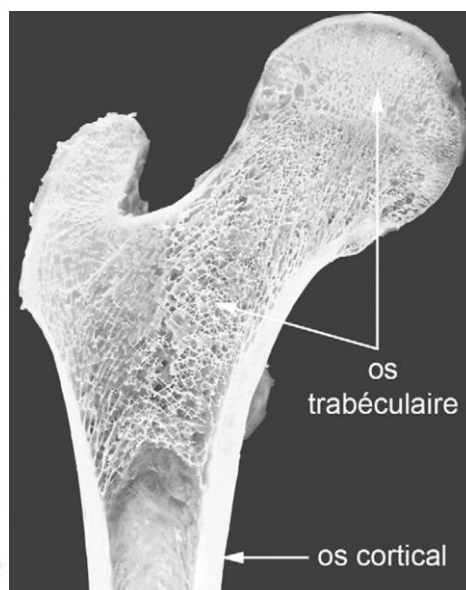
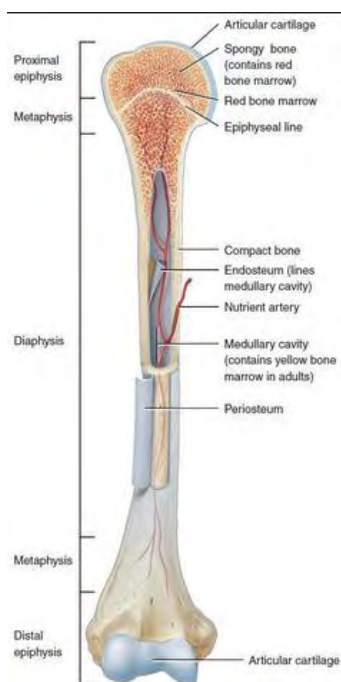


Figure 10 : Différentes portions anatomiques d'un os long(9) Figure 11 : Variétés histologiques d'os(8)

L'os adulte est lamellaire. En effet, la matrice osseuse est disposée en lamelles superposées au sein desquelles les microfibrilles de collagène sont arrangées parallèlement selon une direction qui se modifie dans chaque lamelle successive. Les lamelles sont disposées de façon concentrique dans l'os cortical alors que l'os trabéculaire est constitué de lamelles plates (10)

Chez le jeune enfant, l'os est immature, avec une disposition anarchique des microfibrilles de collagène et une matrice irrégulièrement minéralisée. Cet os non lamellaire, tissé peu résistant est progressivement remplacé par de l'os lamellaire. On retrouve également de l'os non lamellaire dans les cals de fractures, certaines tumeurs osseuses primitives et dans la maladie de Paget (18)

On distingue donc :

Les lamelles osseuses s'organisent par la juxtaposition d'unités de base, appelées « ostéones » ou **systèmes de Havers**, centrées sur des vaisseaux sanguins, dont la forme dépend du type d'os auquel elles appartiennent : **os cortical ou spongieux**

Os cortical et os trabéculaire

Os cortical (ou compact ou haversien)

Il représente environ 80 % du squelette. Il est présent aux diaphyses des os longs ainsi qu'à la périphérie des autres pièces osseuses. Les ostéones corticaux sont cylindriques, constitués de 5 à 20 lamelles osseuses concentriques disposées autour d'un canal central, le canal de Havers. Ce canal, dont l'axe est parallèle à celui de la corticale, contient des capillaires et des filets nerveux amyéliniques. Entre les lamelles, se situent les ostéoplastes contenant le corps cellulaire des ostéocytes (Figure 12). Les canaux de Havers sont reliés entre eux, avec la cavité médullaire et avec la surface de l'os par des canaux transversaux ou obliques, les canaux de Volkmann (Figure 13). Cette disposition confère à l'os cortical un maximum de résistance (Figure 14). Entre les ostéones se trouvent des lamelles osseuses, vestiges d'ostéones anciens partiellement résorbés et constituant les systèmes interstitiels. La diaphyse des os longs est bordée extérieurement et intérieurement par des lamelles osseuses circonférentielles, réalisant le système circonférentiel externe et le système circonférentiel interne. (10)

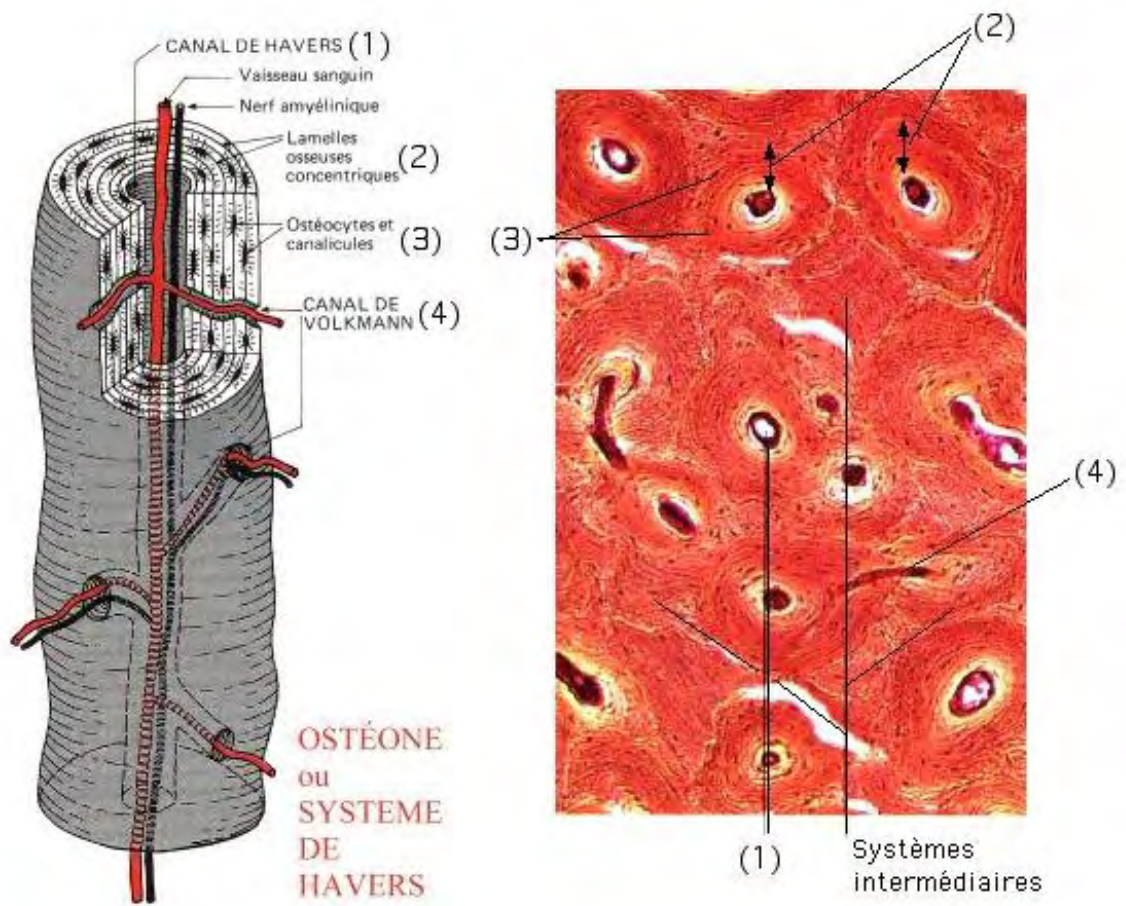


Figure 12 : Organisation de l'os compact (10)

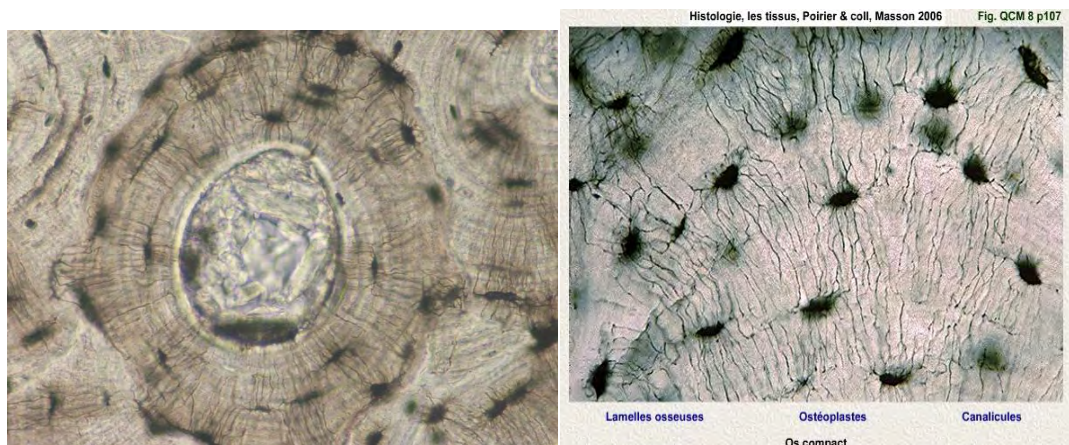


Figure 13 : Os compact montrant des ostéons avec canaux de Havers (10) les ostéocytes et les lamelles osseuses microscopie électronique

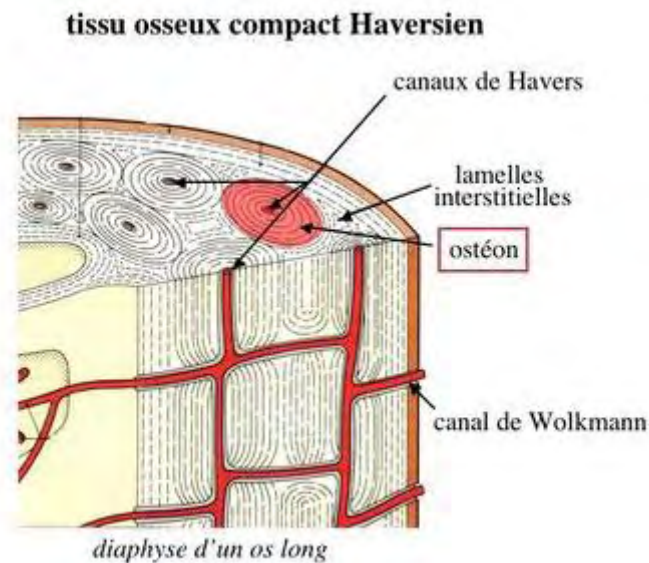


Figure 14 : Tissu compact haversien Configuration 3 D d'os compact(10)

Os trabéculaire (ou spongieux)

Il ne représente que 20 % du squelette adulte et siège essentiellement dans les os courts (os du carpe, vertèbre), les os plats (sternum, aile iliaque, les épiphyses mais aussi les épiphyses et métaphyses des os longs). Il est constitué d'un lavis tridimensionnel de travées osseuses ramifiées (Figure 15) et anastomosées, faites d'unités structurales élémentaires en plaques ou arches, à texture lamellaire régulière. Ces travées délimitent un labyrinthe d'espaces intercommunicants occupés par la moelle osseuse et des vaisseaux. Il représente donc une surface d'échange importante avec les tissus interstitiels, à l'origine d'une activité métabolique intense. Il possède un renouvellement plus rapide que l'os cortical (10)

La plupart des os sont constitués d'une zone externe de tissu osseux compact et d'une zone interne de tissu osseux spongieux

Les os longs, courts ou plats, sont entourés par le *périoste*, constitué par une couche externe de tissu conjonctif fibreux et par une couche interne contenant les cellules ostéoprogénitrices. La cavité centrale des os longs est bordée par l'*endoste*, constitué d'une fine couche de tissu conjonctif contenant des cellules ostéoprogénitrices et des cellules bordantes. Au niveau des surfaces articulaires se trouvent les cartilages articulaires.

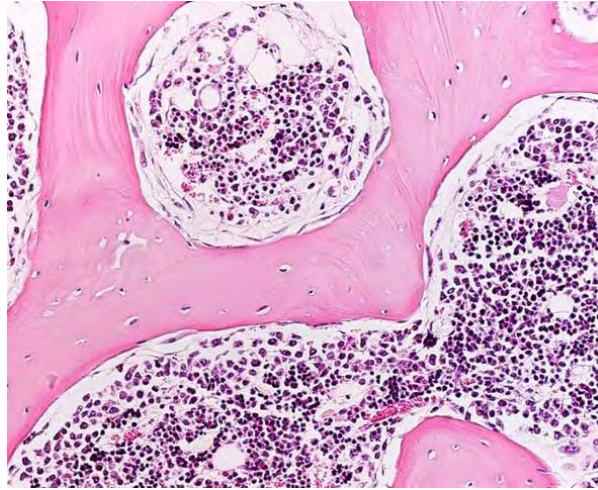


Figure 15 : Os spongieux : travées osseuses, moelle hématogène(7)

4. Remodelage osseux

Le tissu osseux, qu'il soit cortical ou spongieux, est en constant renouvellement. Ce remodelage permet d'assurer l'homéostasie minérale et de préserver les propriétés biomécaniques du tissu osseux, réduisant ainsi le risque de fracture.

4.1 Phases du remodelage osseux

Le remodelage osseux s'effectue grâce à des unités fonctionnelles de remodelage (BMU), dans lesquelles ostéoclastes et ostéoblastes agissent de manière séquentielle et couplée dans l'espace et dans le temps. Un cycle de remodelage dure environ 4 mois chez l'adulte (Figure 16), la phase de formation étant plus longue que celle de résorption (10). Le nombre d'unités de remodelage diffère selon le type d'os : il est beaucoup plus élevé dans l'os spongieux que dans l'os cortical ($4/\text{mm}^3$ contre $0,2/\text{mm}^3$). Il en découle un renouvellement global du squelette plus rapide pour l'os spongieux (25 % par an) que pour l'os cortical (3 à 4 % par an).

Dans une BMU, le remodelage commence par l'activation des cellules bordantes qui recouvrent une surface osseuse inactive. Ces cellules, sous l'action de facteurs ostéorésorbants, se rétractent, exposant ainsi la matrice osseuse aux préostéoclastes. Ces préostéoclastes fusionnent pour devenir des ostéoclastes actifs et adhérents à la surface osseuse : c'est la phase de « résorption » du tissu osseux (Figure 17). La phase d'inversion correspond à l'apoptose des ostéoclastes, qui sont remplacés par des cellules mononucléées de type macrophagique. La phase de « formation » peut alors commencer, caractérisée par le recrutement des ostéoblastes au fond de la lacune (appelé ligne cémentante). Ces ostéoblastes synthétisent initialement une matrice non minéralisée (Figure 18), le tissu ostéoïde, qui

comble la lacune. La minéralisation de la matrice extracellulaire s'effectue dans un second temps au niveau du front de minéralisation, à la jonction entre le tissu ostéoïde et le tissu minéralisé. Une fois la phase de formation achevée, les ostéoblastes cèdent la place aux cellules bordantes qui recouvrent la surface osseuse et demeurent quiescentes jusqu'à une prochaine activation focale des ostéoclastes. Cette phase de « quiescence » est le siège d'une minéralisation secondaire, indépendamment des cellules osseuses, jouant un rôle fondamental dans la résistance mécanique des os (5,19)

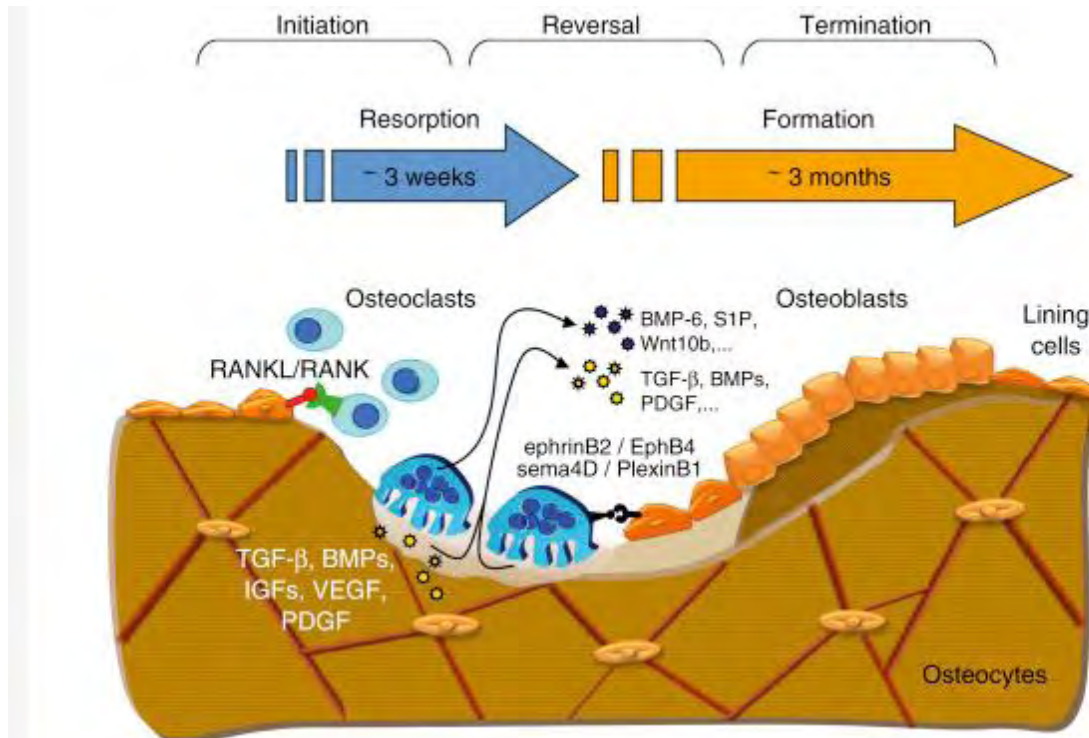


Figure 16 : Les 3 phases du remodelage osseux
Action des cellules et des facteurs locaux (9)



Figure 17 : Zone de résorption par l'ostéoclaste(9)
1 : ostéoclaste 2 : tissu ostéoïde

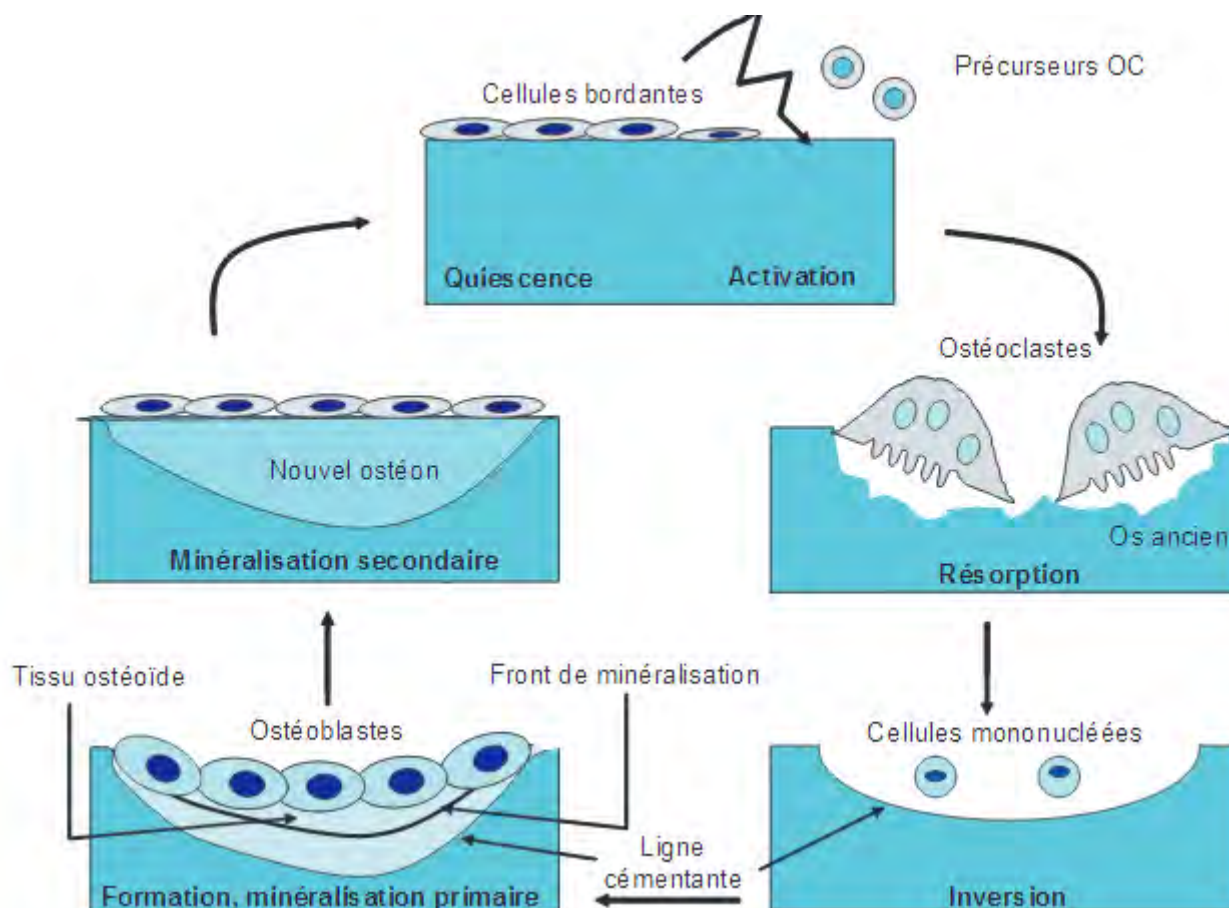


Figure 18 : Les différentes phases du remodelage osseux(20)

Les séquences du remodelage osseux. Divers stimuli amènent les préostéoclastes (OC) sur une surface osseuse qui devient le siège d'une résorption ostéoclastique. Dans la lacune formée, des ostéoblastes viennent déposer la matrice collagénique qui se minéralise dans un second temps.

4.2 Contrôle du remodelage osseux

Le remodelage osseux est sous le contrôle de 3 types cellulaires agissant dans un réseau complexe d'interactions : les facteurs locaux du microenvironnement (cytokines et facteurs de croissance) et les hormones systémiques.

4.2.1 Facteurs locaux

Ces facteurs sont essentiellement produits par les ostéoblastes et les cellules du microenvironnement osseux. L'identification des nouveaux membres de la superfamille du TNF et de ses récepteurs, RANK (receptor activator of nuclear factor kappa B), RANKL (receptor activator of nuclear factor kappa B Ligand) et l'ostéoprotégérine (OPG) a permis une avancée considérable dans la compréhension des mécanismes impliqués dans la résorption osseuse en physiologie et en pathologie. En effet, le système RANK/RANKL exerce un rôle fondamental dans le contrôle du remodelage osseux, la plupart des hormones et cytokines modulant la

résorption osseuse agissant à travers cette voie RANKL, facteur inducteur de la résorption osseuse, (Figure 19) et son récepteur membranaire RANK. RANKL appartient à la famille des ligands TNF. C'est une protéine transmembranaire qui peut également exister sous forme libre. L'expression de RANKL est essentiellement retrouvée dans le tissu osseux (cellules stromales/ostéoblastiques) et les organes lymphoïdes (lymphocytes T). RANKL agit par l'intermédiaire de son récepteur membranaire RANK, exprimé dans le tissu osseux par les ostéoclastes et leurs précurseurs. Le rôle fondamental de RANKL dans la différenciation ostéoclastique est actuellement bien établi. RANKL apparaît comme le facteur essentiel de la coopération entre les cellules stromales/ostéoblastiques et les précurseurs ostéoclastiques, indispensable pour la différenciation de ces derniers (21). *In vitro*, une forme recombinante soluble de RANKL, en association avec le M-CSF, induit la différenciation de précurseurs ostéoclastiques. RANKL stimule la fusion des précurseurs ostéoclastiques mais également l'attachement des ostéoclastes à l'os, l'activité de résorption osseuse et la survie des ostéoclastes. *In vivo*, les souris déficientes pour le gène de RANKL ou de RANK développent une ostéopétrose(18); les souris surexprimant RANKL développent une ostéoporose sévère (22). Ainsi, RANKL agit comme un puissant inducteur de la résorption osseuse

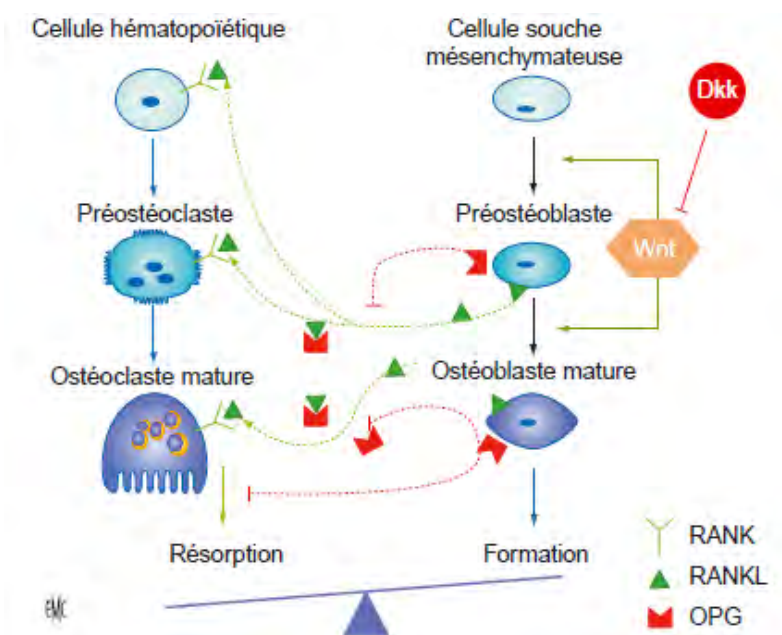


Figure 19 : Mécanismes moléculaires du remodelage osseux.(17) Les ostéoblastes et leurs précurseurs expriment le RANKL sous forme soluble et membranaire. Sa liaison au récepteur RANK (présent sur les ostéoclastes aux différents stades de différenciation) entraîne une activation de la différenciation en ostéoclastes matures, une augmentation de l'activité ostéoclastique responsable d'une augmentation de la résorption osseuse. Ce système est régulé par un inhibiteur, l'ostéoprotégérine qui agit comme un récepteur soluble du RANKL, empêchant ainsi la liaison RANK/RANKL. Les interactions entre la voie de signalisation Wnt/b-caténine et le système RANK/RANKL/OPG constituent une balance de régulation de la résorption et de la formation, assurant ainsi l'homéostasie du tissu osseux. OPG : ostéoprotégérine.

Ostéoprotégérine : inhibiteur de la résorption osseuse

L'ostéoprotégérine est une glycoprotéine de la famille des récepteurs solubles du TNF. Dans l'os, l'OPG est principalement exprimée par les cellules mésenchymateuses (ostéoblastes et cellules stromales). Récepteur soluble de RANKL, l'OPG est un puissant inhibiteur de la résorption osseuse en agissant comme un récepteur piège : l'OPG se lie à RANKL et bloque ainsi les interactions entre RANKL et RANK. Les souris transgéniques qui surexpriment OPG développent une ostéopétrose caractérisée par un défaut de la différenciation ostéoclastique (23) tandis que les souris transgéniques déficientes en OPG développent une ostéoporose sévère avec une augmentation de la différenciation et de l'activité des ostéoclastes(20). Les études *in vitro* ont montré que l'OPG était un puissant facteur inhibiteur de la différenciation ostéoclastique, de l'activité de résorption osseuse et de la survie des ostéoclastes. *In vivo*, l'administration d'OPG chez le rat entraîne une augmentation de la densité minérale osseuse et du volume osseux, avec une diminution rapide du nombre d'ostéoclastes actifs ; elle prévient également la perte osseuse secondaire à l'ovariectomie (24). Dans le tissu osseux, l'OPG et RANKL sont tous les deux exprimés et sécrétés par les cellules stromales et ostéoblastiques. Leur production relative pourrait moduler la capacité de ces cellules à stimuler la différenciation et l'activité des ostéoclastes, et donc le niveau de résorption osseuse

Régulation de l'expression de RANKL et de l'OPG dans les cellules osseuses

De très nombreux travaux ont montré l'existence d'une régulation de l'expression de RANKL et de l'OPG par les facteurs locaux ou systémiques impliqués dans la résorption osseuse. Ainsi (Figure 20), les facteurs ostéotropes connus pour stimuler la résorption osseuse tels que les hormones parathormone (PTH) et 1,25(OH)₂vitD, les cytokines IL-1, TNF- α , IL-6 et IL-11, les PGE₂ et les glucocorticoïdes stimulent l'expression de RANKL par les cellules stromales/ostéoblastiques. Ces mêmes facteurs diminuent l'expression de l'OPG et/ou augmentent le rapport RANKL/OPG (25)

Parmi les cytokines inhibitrices de la résorption osseuse, l'IL-4 diminue l'expression de RANKL, le TGF- β inhibe l'expression de RANKL et stimule celle de l'OPG (26).

LA RÉGULATION DE LA RÉSORPTION OSSEUSE DÉPEND DE L'ÉQUILIBRE RANKL/OPG

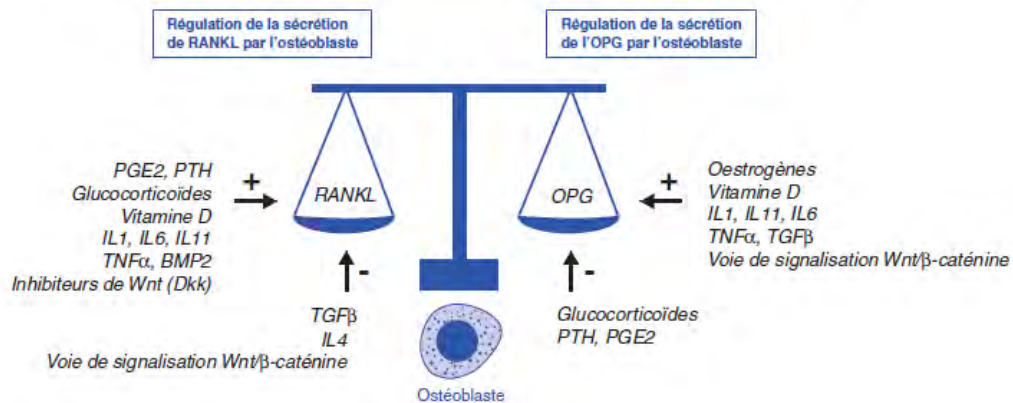


Figure 20 : Régulation de la sécrétion de RANKL et de l'OPG par les ostéoblastes. (8)

Régulation du système RANKL-OPG par la voie canonique Wnt/ β -caténine

La signalisation *via* la voie canonique de Wnt stimule l'expression d'OPG (21) et inhibe l'expression de RANKL. Par ailleurs, il existe des sites de liaison du TCF (facteur de transcription associé à la β -caténine) sur le promoteur de RANKL et la surexpression de β -caténine est capable d'inhiber l'activité du promoteur de RANKL. Une diminution de la signalisation Wnt ou l'administration de Dkk, inhibiteur physiologique de la voie Wnt, stimulent l'expression de RANKL, la formation ostéoclastique, et la résorption osseuse (26). Ces études suggèrent que la voie de signalisation Wnt exerce un effet de contrôle négatif sur l'expression de RANKL.

Rôle de RANKL et de l'ostéoprotégérine dans les pathologies avec hyper-résorption osseuse

Compte tenu du rôle majeur du système RANKL/RANK et OPG dans la résorption osseuse, il était logique de penser que cette voie pouvait être impliquée dans les pathologies caractérisées par une résorption osseuse excessive, avec comme ouverture un intérêt thérapeutique potentiel d'inhibiteurs de ce système. Ainsi, une augmentation de l'expression de RANKL a été objectivée dans l'ostéolyse maligne au cours du myélome et des métastases ostéolytiques, dans le pannus synovial de la polyarthrite rhumatoïde et dans la perte osseuse par carence œstrogénique (27).

4.2.2 Rôle des hormones

Parathormone

La parathormone, sécrétée par les parathyroïdes, régule la calcémie et le métabolisme osseux. La forme active de la PTH est un peptide de 84 acides aminés dont le fragment N-terminal (1-

34) est porteur de l'activité biologique. La PTH, stimulée par l'hypocalcémie, entraîne une résorption osseuse avec augmentation du nombre et de l'activité des ostéoclastes, induisant ainsi un flux de calcium de l'os vers le sang (Figure 21). Cependant, les effets de la PTH sont complexes puisque cette hormone possède également un effet anabolique sur l'os en raison d'une triple action sur les ostéoblastes : 1/ la conversion des cellules bordantes en ostéoblastes 2/ stimulation de l'expression de facteurs de croissance (IGF, FGF, TGF- β) par les ostéoblastes matures. 3/ et inhibition de leur apoptose (28). Enfin, la PTH est le principal facteur qui stimule la synthèse rénale du calcitriol à partir de la 25(OH)vitD circulante, qui lui-même module le remodelage osseux

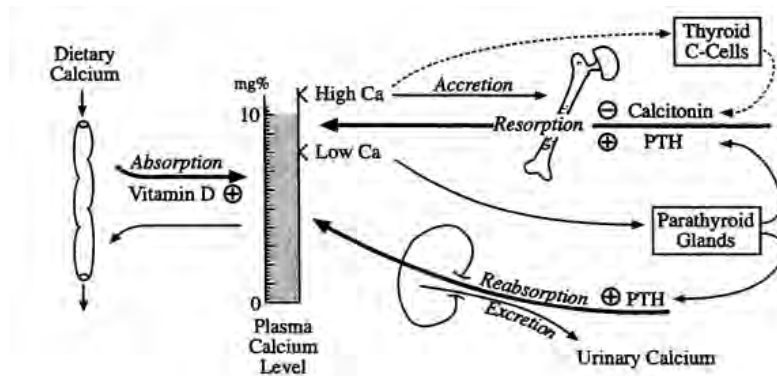


Figure 21 : Régulation de la calcémie par la parathormone et la calcitonine(29)

Calcitonine

La calcitonine, peptide de 32 acides aminés, est une hormone hypocalcémisante sécrétée par les cellules C de la thyroïde. C'est l'une des rares hormones qui agit directement sur les ostéoclastes. La calcitonine a une action « antirésorption » en inhibant la fonctionnalité des ostéoclastes et en accélérant leur apoptose. Sous l'action de la calcitonine, la résorption est également inhibée par la prostaglandine E2 qui possède des récepteurs sur les ostéoclastes. Cependant, le rôle de la calcitonine dans la régulation du métabolisme osseux reste modéré et son mode d'action exact demeure mal connu (30).

Vitamine D

Au niveau de l'épiderme, les rayons UVB (ultraviolets B) permettent la transformation de la provitamine D3 d'origine hépatique en prévitamine D3, puis en vitamine D3 (cholécalficérol ou calciol). Différents facteurs influent sur cette photosynthèse épidermique : la mélanine (abondante chez les personnes à peau mate), le vieillissement (altération de la synthèse

cutanée de vitamine D3) et l'épaisseur de la couche d'ozone (variable selon les saisons, les latitudes, la nébulosité et la pollution). On signalera enfin qu'une faible quantité de vitamine D3 exogène provient des produits laitiers et des huiles de foie de poissons. La vitamine D2 (ergocalciférol) constitue également une petite source exogène d'origine végétale de vitamine D. Ces deux formes exogènes sont absorbées dans l'intestin grêle au sein de micelles constituées d'acide gras et de sels biliaires.

Les vitamines D3 et D2 sont ensuite captées par une protéine transporteuse et acheminées par la circulation sanguine vers le foie où elles subissent une hydroxylation sur le carbone 25, ce qui aboutit à la formation de la 25(OH)vitD (calcidiol). Il s'agit de la principale forme de stockage de la vitamine D, son taux sérique (20 à 200 nmol/L) reflétant les réserves en vitamine D de l'organisme.

La 25(OH)vitD est ensuite transportée jusqu'aux tubules rénaux proximaux où elle subit une deuxième hydroxylation sur le carbone 1 ou 24. La 1,25(OH)₂vitD (calcitriol) représente la forme active de la vitamine D. Elle a une durée de vie courte (6 heures) et un taux sérique quasi constant. Sa production, directement corrélée aux besoins de l'organisme, est limitée. Le rôle essentiel de la 1,25(OH)₂vitD est de réguler le taux de la forme active.

La 1,25(OH)₂vitD possède deux rôles apparemment contradictoires sur le squelette : assurer le dépôt de calcium sur la matrice ostéoïde et maintenir les taux sériques de calcium et de phosphore en stimulant l'ostéoclasie, en collaboration avec la PTH. Au niveau du rein, la 1,25(OH)₂vitD favorise la réabsorption tubulaire de phosphate. Elle favorise également l'absorption intestinale de phosphate et de calcium en induisant la synthèse d'un transporteur protéique membranaire spécifique, le *Calcium-Binding Protein* (CaBP). Ce passage actif de calcium est couplé à un passage passif de phosphate.

La régulation de la production de vitamine D s'effectue principalement par l'intermédiaire de la 1- α -hydroxylase rénale. La PTH, relarguée en cas d'hypocalcémie, d'hypophosphatémie ou d'hyperprolactinisme, stimule cette synthèse enzymatique, ce qui aboutit à la formation de vitamine D (Figure 22). Cette dernière exerce alors un rétrocontrôle négatif direct sur la synthèse de PTH et indirect en normalisant la calcémie et la phosphatémie. Elle régule également son propre taux en favorisant la 24,25 hydroxylase et en inhibant la 1- α -hydroxylase (31).

La carence en vitamine D entraîne donc une augmentation de la sécrétion de PTH à l'origine d'une déminéralisation des os qui s'appauvrissent en calcium et en phosphore, provoquant

ainsi, en cas de carence profonde et prolongée, un rachitisme chez l'enfant et une ostéomalacie chez l'adulte

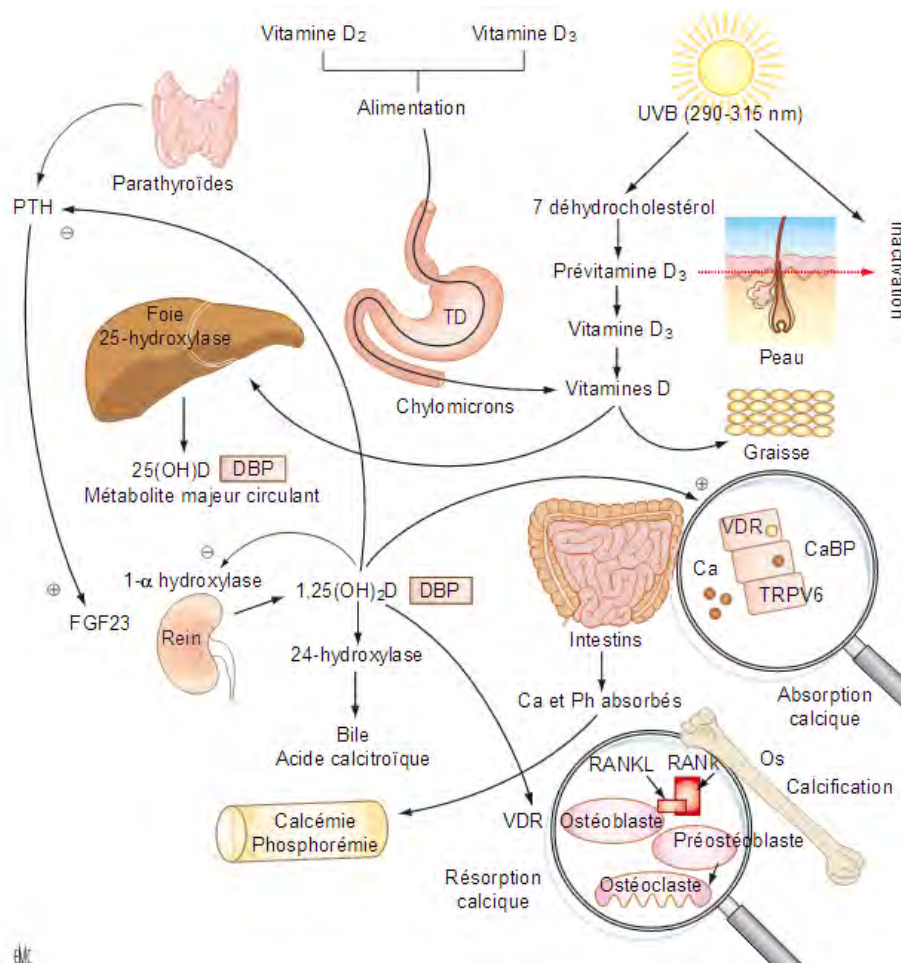


Schéma de la synthèse de la vitamine D.(31)

Figure 22 : Synthèse et métabolisme de la vitamine D. UVB : rayons ultraviolets B ; PTH : parathormone ; TD : tube digestif ; DBP : D binding protein ; VDR : récepteur vitaminique D ; FGF : fibroblast growth factor Ca : calcium ; Ph : phosphore ; CaBP : calcium binding proteins

Hormones sexuelles

En dehors des hormones calciotropes citées, les œstrogènes sont les principaux régulateurs hormonaux du remodelage du tissu osseux, indépendamment du sexe. La privation d'œstrogènes à la ménopause induit une perte osseuse qui peut conduire à l'ostéoporose post-ménopausique. Il est clairement établi que ce sont les ostéoblastes qui sont la cible des œstrogènes pour inhiber l'ostéoclastogénèse. Les œstrogènes inhibent la synthèse d'IL-6 et de RANKL par les cellules stromales et ostéoblastiques et sont de puissants inhibiteurs de la résorption ostéoclastique (5)

Hormones thyroïdiennes

L'hormone T3 est connue pour stimuler la résorption osseuse dans des cultures d'organes. Le modèle de souris transgénique sans cellule thyroïdienne présente une croissance osseuse réduite. Chez l'humain, l'hyperthyroïdie est responsable d'une perte osseuse liée à un hyper-remodelage osseux (5).

Hormone de croissance

Elle est sécrétée par l'hypophyse et a des effets stimulateurs sur la croissance de nombreux organes. Les effets stimulateurs sur la formation osseuse peuvent être directs en agissant sur des récepteurs spécifiques, ou indirects *via* la stimulation de la production d'IGF-1(5).

La leptine et le contrôle de la masse osseuse par le système nerveux

La leptine est un peptide de 16 kDa, produit du gène *ob*. Elle régule la satiété et le poids corporel et agit dans ce cadre comme une hormone sur l'hypothalamus. Elle est produite par les adipocytes. La leptine stimule *in vitro* la différenciation des cellules stromales en ostéoblastes aux dépens du lignage adipocytaire . Il semble que la leptine exerce des effets complexes sur le métabolisme osseux par le biais d'un équilibre entre des effets centraux inhibiteurs et périphériques stimulateurs de la fonction ostéoblastique(32). Le système nerveux sympathique paraît être un médiateur puissant de messages issus de l'hypothalamus. Il a d'ailleurs été montré récemment que les souris déficientes en catécholamines ont une masse osseuse élevée et l'administration de sympathomimétiques à ces souris diminue l'activité ostéoblastique et la masse osseuse. De plus, l'administration de bêta-bloquants augmente la masse osseuse et prévient la perte osseuse liée à l'ovariectomie dans des modèles animaux (20).

Stress oxydant et perte osseuse

Dans les systèmes biologiques, des enzymes, des métaux de transition, des agents physiques (radiations ionisantes, UV) engendrent des radicaux libres (stress oxydant) qui sont généralement très réactifs et très instables. Afin de stabiliser leur structure, ces composés interagissent avec l'organisme, déclenchant souvent des réactions d'oxydation en chaîne qui génèrent une altération des lipides membranaires, de l'ADN, des protéines cellulaires, une augmentation du calcium intracellulaire, une perturbation des processus mitochondriaux, voire la mort cellulaire (Figure 23).

Des données *in vivo* et *in vitro* soutiennent l'hypothèse que le stress oxydant pourrait jouer un rôle important dans le métabolisme osseux. On sait qu'*in vitro*, les espèces réactives de l'oxygène (ROS) stimulent la résorption ostéoclastique. Il a été montré que le taux des réductases du glutathion et de la thiorédoxine, responsables du maintien de ces molécules sous forme réduite, diminue dans la moelle osseuse chez la rate ovariectomisée et que ces taux sont rapidement normalisés par le 17 bêta-œstradiol. De plus, la vitamine C et la N-acétyl-cystéine, qui sont des antioxydants connus pour accroître la teneur en glutathion dans les tissus, sont capables de prévenir totalement la perte osseuse induite par l'ovariectomie (33). Des données chez la femme corroborent cette hypothèse et montrent qu'il existe une diminution nette des antioxydants endogènes et exogènes chez des femmes ostéoporotiques comparées à des femmes saines de même âge (20).

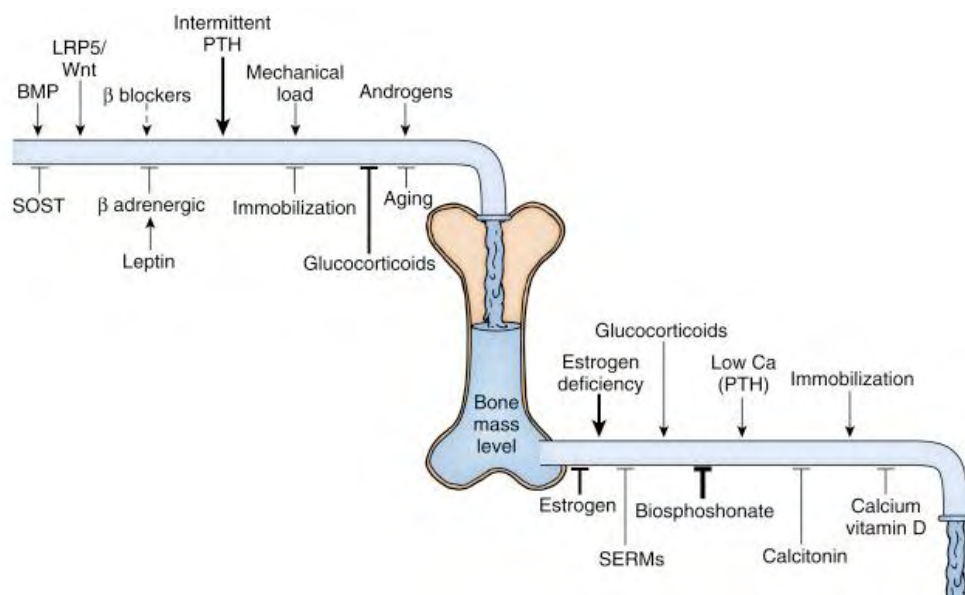


Figure 23 : Contrôle de l'homéostasie de la masse osseuse : récapitulatif (9)
 BMP: bone morphogenetic protein; *SERM*, Selective estrogen receptor modulator

5. Capital osseux et perte osseuse

Jusqu'à l'âge de 20 ans, la masse osseuse augmente progressivement. A cet âge, le capital osseux est constitué ; il reste stable pendant quelques années, puis diminue lentement avec l'âge, chez la femme comme chez l'homme, les mécanismes de destruction du tissu osseux l'emportant sur les mécanismes de construction. Chez la femme, la perte osseuse s'accélère

nettement à la ménopause (Figure 24), du fait de la carence en œstrogènes. Cette ostéoporose augmente considérablement le risque de fracture et justifie parfois un traitement œstrogénique substitutif prolongé des femmes après la ménopause. (10)

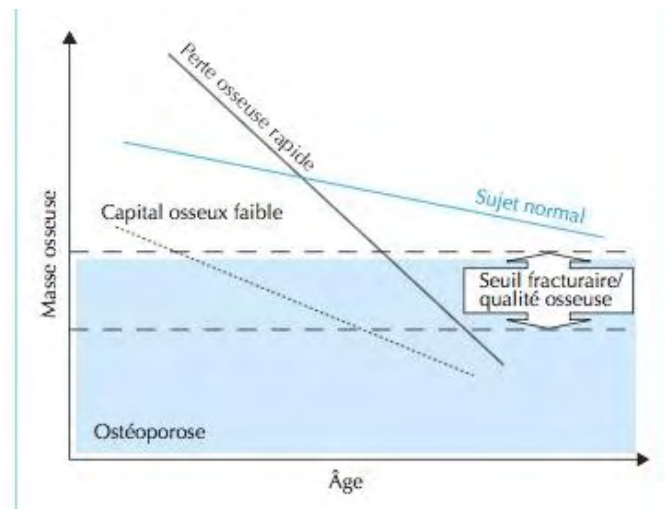


Figure 24 : Capital osseux et risque fracturaire (20)

6. L'os peut se réparer spontanément après une fracture

Une fracture, comme toute blessure, entraîne une destruction tissulaire et une hémorragie. Des signaux chémoattractants et d'angiogénèse attirent sur place les cellules impliquées dans les phases initiales du processus de réparation. Les granulocytes neutrophiles et les macrophages éliminent localement les débris cellulaires. Les cellules mésenchymateuses et les capillaires sanguins prolifèrent et permettent la formation de tissu conjonctif puis de tissu cartilagineux qui forment un cal et comblent le foyer de fracture. Parallèlement, les cellules ostéoprogénitrices (du périoste et de l'endoste) prolifèrent et se différencient en ostéoblastes qui fabriquent du tissu ostéoïde qui progressivement remplace l'ébauche cartilagineuse du cal qui se calcifie. Le cal osseux est ensuite remodelé par les ostéoclastes pour restaurer la forme originale de l'os fracturé. Ces différents événements cellulaires sont sous la dépendance de facteurs moléculaires impliqués dans la formation des os au cours du développement (en particulier, le TGF- β , les BMP et les IGF).

La réparation d'une fracture est favorisée par l'immobilisation des fragments osseux (plâtre, ostéosynthèse chirurgicale) et dure normalement 6 à 12 semaines selon le type de fracture (10).

Chapitre II: La fragilité osseuse et l'ostéoporose

1. Définitions

La fragilité osseuse s'intègre chez les sujets âgés dans le cadre du syndrome de fragilité générale. Ses facteurs de risque sont représentés par un âge élevé, une perte de poids et un faible poids corporel, des niveaux faibles de masse et de force musculaire, une activité physique et une mobilité faibles. Les contraintes mécaniques réduites chez les sujets âgés fragiles deviennent insuffisantes pour la maintenance de la masse osseuse (34).

La traduction clinique et biologique ainsi que l'imagerie médicale font apparenter la fragilité osseuse à une entité représentée principalement par l'ostéoporose quelle qu'en soit l'étiologie. Une fracture de fragilité est souvent le premier indice d'une ostéoporose.

L'ostéoporose a été définie par le consensus de 2001 comme : « *une anomalie diffuse du squelette caractérisée par une faible masse osseuse et une altération de la microarchitecture du tissu osseux, qui prédispose une personne à un risque accru de fracture* »

La même définition a été énoncée avec ces mêmes termes lors de la conférence internationale de consensus de Hong Kong en 1993 et celle d'Amsterdam en 1996. (34).

L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), en 1994 définit quant à elle l'ostéoporose comme étant «...une maladie généralisée du squelette caractérisée par une baisse de la densité osseuse et des altérations de la micro-architecture trabéculaire osseuse, conduisant à une fragilité osseuse exagérée et donc à un risque élevé de fractures»(35).

L'ostéoporose correspond donc à une diminution de la masse de tissu osseux normalement minéralisé dans une ou plusieurs pièces squelettiques. Elle est en rapport avec une insuffisance de formation de la matrice protéique, incapable de compenser une destruction osseuse physiologique ou pathologique.

À côté des fractures de l'ostéoporose; les fractures isolées de l'enfant et de l'adulte jeune consécutives à des traumatismes d'intensités variables, ainsi que les fragilités osseuses juvéniles représentent un cadre pathologique vaste(36), qui peut aussi bénéficier de traitements par des plantes médicinales dans une certaine mesure à côté des traitements médicaux, orthopédiques et chirurgicaux adaptés

2. Épidémiologie

La fragilité osseuse dont le chef de file est l'ostéoporose est une maladie fréquente. Elle représente un problème majeur de santé publique en raison de la morbidité et de la mortalité associées aux fractures ostéoporotiques. En se basant comme le préconise l'OMS sur la mesure de la DMO (densité minérale osseuse) : 30 % des femmes ménopausées sont considérées comme ostéoporotiques.(37)

On estime aujourd'hui que 40 % des femmes et 12 % des hommes de plus de 50 ans auront au moins une fracture ostéoporotique dans leur vie, de plus une précédente fracture augmente de 2 à 5 fois le risque d'une nouvelle fracture.

A 50 ans le risque de fracture est bien supérieur aux risques combinés de cancer du sein, des ovaires et de l'utérus chez la femme et du cancer de la prostate que chez l'homme(37).



Figure 25 : Estimation du risque de fractures d'ostéoporose (37)

On s'attend à une multiplication entre 2 à 4 fois l'incidence des fractures dans les prochaines décennies en raison de l'augmentation de la longévité, mais aussi de la détérioration de l'hygiène de vie.

Dans le monde on a déploré 3 millions de fractures ostéoporotiques (2010) et on prévoit 6,5 millions de fractures ostéoporotiques (2050)

Les fractures de fragilité entraînent une importante morbidité, diminuent la qualité de vie et accroissent la mortalité (Figure 25).

- 10 à 25 % de mortalité en plus

- 50 % des personnes atteintes sont incapables de marcher seules après une fracture de hanche
- 50 % des personnes atteintes affichent un déclin considérable du niveau d'autonomie(37).

La fréquence de l'ostéoporose au Maroc est estimée à 30% chez les femmes et 8% chez les hommes de plus de 50 ans (38)

Un élément est cependant rassurant. Les données actuelles depuis les années 2000 indiquent que dans plusieurs pays, l'incidence des fractures de hanches diminue. Ceci s'expliquerait par l'amélioration des conditions nutritionnelles (meilleur pic de masse osseuse), la diminution de la consommation tabagique chez l'homme et l'amélioration de la prise en charge de l'ostéoporose(39).

3. Physiopathologie

Les variations que connaît le métabolisme phosphocalcique dépendent de l'âge et des situations physiologiques et pathologiques.

3.1 Dans les ostéoporoses primitives et post ménopausique

La masse osseuse d'un individu à un instant donné dépend du pic d'acquisition osseuse à la fin de l'adolescence et de la quantité d'os perdue après l'âge de 35–40 ans. Elle dépend donc de facteurs génétiques à hauteur de 70 à 80 % (héritabilité du pic de masse osseuse) mais également nutritionnels, hormonaux et environnementaux.

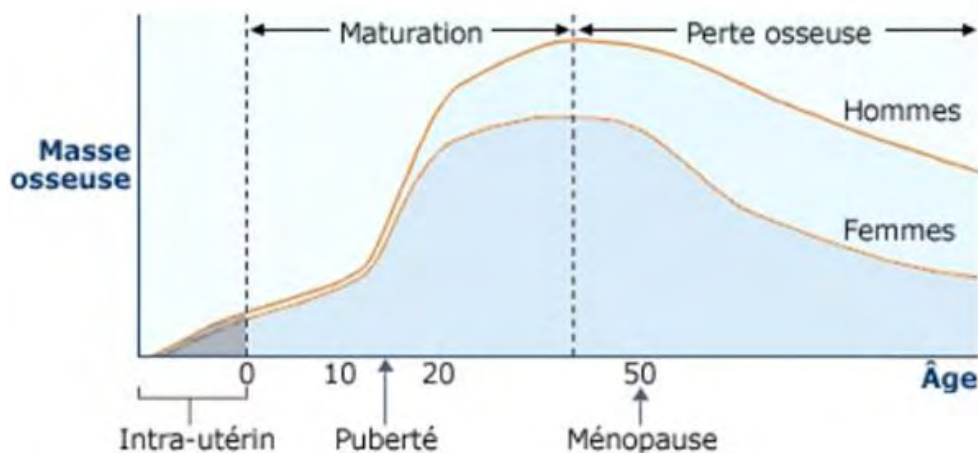


Figure 26 ; Evolution de la masse osseuse en fonction de l'âge (37)

À partir de 35–40 ans, il existe une diminution progressive de la masse osseuse d'environ

0,4 % par an, prédominant sur l'os spongieux Elle résulte d'une augmentation du remodelage osseux cortical et spongieux au profit de l'activité ostéoclastique. Avec l'âge, la perte osseuse trabéculaire est égale chez l'homme et la femme alors que l'os cortical serait mieux préservé chez l'homme, comme en témoigne la plus grande fréquence de fractures chez la femme(8).

À la *ménopause*, la privation œstrogénique entraîne une accélération de la perte osseuse par excès de résorption. L'augmentation du nombre d'unités de remodelage actives favorise l'amincissement des corticales et l'augmentation de leur porosité, et accroît la probabilité de perforations des travées osseuses au sein du réseau trabéculaire. Il en résulte une fragilisation du squelette et la survenue de fractures (Figure 26), le plus souvent vertébrales(8).

À ces processus, il faut ajouter une modulation supplémentaire du métabolisme squelettique, via le développement d'une inflammation chronique et d'un stress oxydant (40) qui se traduisent par une composante vasculaire et cellulaire qui coexistent, à laquelle sont associés des phénomènes de destruction que la ménopause et une synthèse de cytokines inflammatoires. En cas d'hystérectomie, une élévation du GM-CSF(*Granulocyte Macrophage Stimulating Factor*), ainsi que de l'IL1 (interleukine 1) et du TNF (*Tumor Necrosis Factor*) est démontrée, respectivement une et deux semaine(s) après le retrait chirurgical des ovaires et une hormonothérapie substitutive permet de corriger ces perturbations (41). Ce phénomène est exacerbé avec l'avancée en âge : les concentrations en IL6 triplent chez la femme entre 24 et 87 ans. En fait, la coexistence sur un même site, c'est-à-dire dans la cavité médullaire, des systèmes hématopoïétique et osseux explique de telles interactions. Le terme « ostéoimmunologie » a d'ailleurs été proposé, afin de prendre en considération le dialogue entre le squelette et le système immunitaire (42). IL1, IL6, TNF, GM-CSF, M-CSF sont, ainsi, de puissants stimuli de la résorption osseuse. Ceci explique que les variations des cytokines inflammatoires, à la ménopause, sont corrélées à des perturbations des paramètres de résorption. D'autre part, il existe une relation très étroite entre inflammation et stress oxydant car les cytokines pro-inflammatoires sont, en fait, susceptibles d'induire la production phagocytaire d'espèces oxygénées radicalaires. C'est pourquoi la carence hormonale engendre également une perturbation des défenses antiradicalaires(43), qui se traduit par une augmentation des taux de H₂O₂, une peroxydation lipidique, ainsi qu'une réduction des enzymes antioxydantes. Or, les radicaux libres sont toxiques pour les ostéoblastes (inhibition du processus de différenciation à partir de préostéoblastes (MC3T3-

E1)), alors qu'ils activent les ostéoclastes. Il en résulte une altération de l'activité de formation associée à une résorption accélérée (2).

Chez l'homme, la prévalence plus faible de l'ostéoporose s'explique par l'absence d'équivalent de la ménopause mais également par un capital osseux initial plus élevé, une meilleure qualité osseuse et des chutes moins fréquentes(8).

Chez le sujet âgé, la capacité d'absorption digestive du calcium diminue alors que la quantité même de calcium ingérée est réduite. On note également une diminution de l'apport alimentaire de vitamine D3, une diminution de l'exposition au soleil et une altération de la synthèse cutanée de vitamine D3(8). Alors qu'un déficit profond et prolongé en vitamine D conduit à une ostéomalacie, un déficit moins prolongé chez le sujet âgé contribue à l'apparition d'une hypocalcémie transitoire, qui est rapidement compensée par une hypersécrétion de parathormone. Cette hyperparathyroïdie secondaire, très fréquente chez le sujet âgé, entraîne une hyper-résorption osseuse (44). De même, l'amplitude et la fréquence de sécrétion de la GH diminuent, ce qui conduit à une réduction de la production d'IGF-1 par le foie et les autres tissus. La diminution de ce facteur de croissance pourrait expliquer certaines modifications microarchitecturales trabéculaires, notamment l'amincissement des travées. De plus, cette diminution d'IGF-1 favorise la production de SHGB (*Sex Hormone Binding Globulin*) par les hépatocytes et pourrait contribuer à la réduction des stéroïdes sexuels biodisponibles chez l'homme (8). Enfin, on observe une augmentation de l'IGFBP-2 (*Insulin-like Growth Factor-Binding Protein*), protéine porteuse inhibant l'action de l'IGF-1, à l'origine d'une augmentation des marqueurs du remodelage osseux et d'une diminution de la DMO.

Facteurs de risque d'ostéoporose idiopathique.

Génétiques	Ethnie (caucasienne et asiatique > africaine) Maladies génétiques (Lobstein, Marfan, Ehlers-Danlos) Antécédent familial de fracture ostéoporotique Petite taille Faible indice de masse corporelle
Gonadiques	Puberté tardive (> 15 ans) Anorexie mentale Ménopause précoce (< 40 ans) Absence de contraception orale, grossesses multiples, allaitement (?)
Environnement	Intoxication tabagique Faible exposition solaire
Nutritionnels	Intoxication alcoolique (plus de 3 verres par jour) Apport calcique faible (moins de 800 mg/j) Carence en vitamine D (25 OH-D < 30 ng/ml) Malnutrition Nutrition parentérale Apports protidiques, phosphatés, sodés élevés (entraînant une hypercalciurie) Café (?)
Activité physique	Vie sédentaire Immobilisation prolongée

25 OH-D : 25-hydroxyvitamine D

Tableau 1 : Facteurs de risque de l'ostéoporose idiopathique(45)

3.2 Dans les ostéoporoses secondaires

En dehors de l'âge et du statut post-ménopausique, d'autres facteurs favorisent la baisse de la masse osseuse (45). Certaines études suggèrent que ces facteurs interviennent dans 20 à 30 % des ostéoporoses considérées comme post-ménopausiques (46) et dans 50 à 70 % des ostéoporoses masculines.

Toute carence en protéines et calcium biodisponible s'avère très délétère pour le squelette.

Enfin, autres éléments à considérer, car éventuellement impliqués dans l'apparition d'une ostéopénie (dans certaines conditions), sont les situations d'acidose modérée(2), chronique, qui peuvent survenir au cours du vieillissement (les capacités rénales d'excrétion d'acidité

diminuent avec l'âge) et/ou à cause de l'ingestion de régimes acidifiants. Le squelette contient effectivement une réserve massive de base, qui est disponible pour tamponner les ions H^+ , si le rein et les poumons ne sont plus en mesure de maintenir l'équilibre acido-basique dans des limites étroites(2). Sur un plan nutritionnel, l'acidose métabolique latente (AML) résulte essentiellement d'un déséquilibre entre la production d'ions sulfate (consécutives au catabolisme des acides aminés soufrés) et les capacités alcalinisantes de l'organisme.

La résorption ostéoclastique est stimulée directement par les ions H^+ , une réduction de quelques centièmes d'unités pH entraînant un doublement de la formation de puits de résorption. L'acidose affecte aussi la fonction ostéoblastique de façon défavorable (inhibition *in vitro* de la minéralisation à pH 6,9). Toutefois, l'apport alimentaire de sels organiques de potassium (citrate, malate), essentiellement par les fruits et légumes, permet de générer du bicarbonate de K et d'épargner les constituants des os et des muscles dans la lutte contre l'acidose(47).

4. Anatomie pathologique et génétique

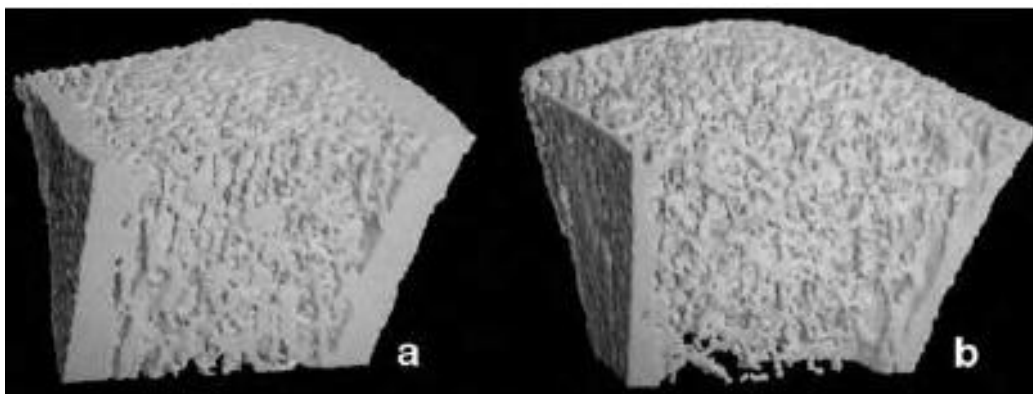


Figure 27 : Microscanner du radius : différence entre une femme ostéoporotique (b) et un sujet sain (a)(44)

Sur le plan génétique l'ostéoporose est une maladie multifactorielle liée à de nombreux facteurs d'environnement mais aussi à des facteurs génétiques dont l'analyse est difficile en raison du caractère polygénique de cette affection.

L'identification de ces facteurs permettrait de mieux comprendre la physiopathologie de cette affection et peut-être de mieux prédire le risque de fractures et d'envisager de nouveaux traitements.

Un grand nombre d'études concernant les gènes candidats impliqués dans différentes voies du métabolisme osseux et plus récemment des études d'association à l'échelle du génome ont été réalisées, mais la contribution des gènes identifiés reste modeste. Des progrès ont été effectués dans la compréhension de la pathogénie des ostéomalacies ou rachitismes héréditaires hypophosphatémiques avec la découverte de mutations de différents gènes (PHEX, FGF23, DMP1, SLC34A3) et de l'hypophosphatasémie qui s'accompagne d'une mutation du gène de la phosphatase alcaline non tissu spécifique. (48,49)

Sur le plan histologique la fracture se définit par la rupture de la continuité d'un os. Elle se produit lorsque les forces ont une intensité normale mais qu'elles s'appliquent à un os dont la compétence mécanique est diminuée (insuffisante). Les contraintes responsables de la fracture par insuffisance osseuse sont celles de la vie quotidienne. Elle résulte d'un traumatisme plus ou moins violent. Elle est spontanée ou pathologique quand elle se produit sur un tissu osseux anormal tel que nodule métastatique, anomalie congénitale ou par insuffisance osseuse en rapport avec l'ostéoporose post-ménopausique, la polyarthrite rhumatoïde, la corticothérapie au long cours...

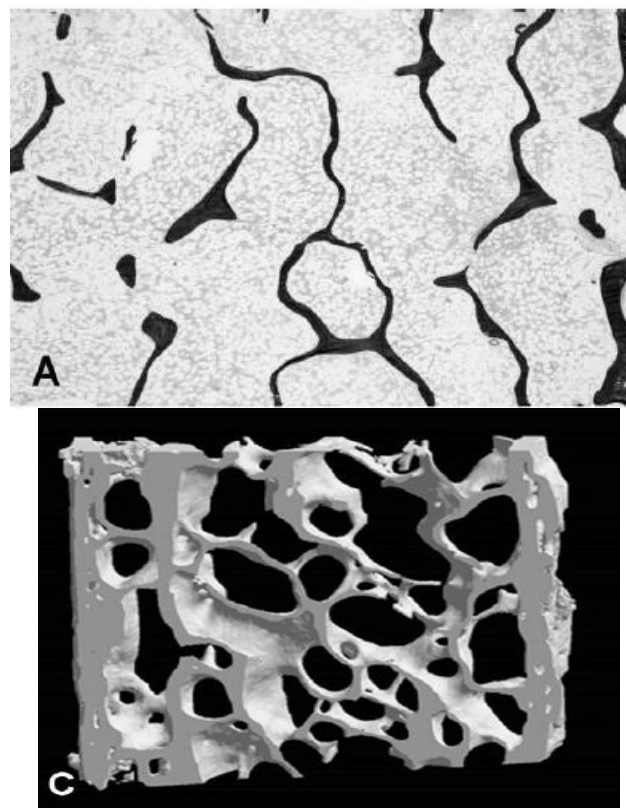


Figure 28 : Structure en microscopie électronique de biopsies d'ostéoporose (50)

A. Analyse d'une biopsie osseuse montrant le réseau trabéculaire fait de travées amincies, coloration de Goldner, grossissement original $\times 100$.

C. Analyse microarchitecturale d'une biopsie osseuse microtomographie à rayons X

L'os ostéoporotique est caractérisé par un cortex osseux aminci avec des canaux de Havers élargis (Figure 27). L'os spongieux est fait de travées grêles anormalement espacées dans une moelle non fibrosée et relativement abondante (Figure 28). Ce tissu paraît anormalement minéralisé, contrairement à ce que l'on observe dans l'ostéomalacie ou le rachitisme, qui est un défaut de minéralisation de la trame protéique et qui aboutit à l'accumulation de tissu ostéoïde. L'activité ostéoblastique paraît peu diminuée, par contre l'activité ostéoclastique paraît augmentée(50).

Le tissu osseux se maintient dans les régions critiques (sujettes aux contraintes les plus élevées) mais l'équilibre est précaire. Cela explique que l'os trabéculaire soit le siège principal des fractures de contrainte.

5. Étiologies

L'ostéoporose primitive est principalement féminine, liée à l'âge et à la ménopause, on décrit aussi les ostéoporoses juvéniles. Les ostéoporoses secondaires, iatrogènes, toxiques, endocriniennes, métaboliques... sont plus fréquentes chez l'homme.

5.1 Ostéoporose primitive

L'ostéoporose post-ménopausique est la plus fréquente des ostéopathies fragilisantes. Elle correspond à une perte osseuse accélérée survenant après la ménopause, suite à une chute des taux d'estrogènes.

Elle est responsable de fractures survenant pour des traumatismes minimes (équivalents à une chute de sa hauteur) et qui ont des conséquences individuelles et sociétales reconnues en termes de morbidité et de coût. Elles sont fréquentes

Mais l'ostéoporose ne concerne pas que les femmes ; 30 % des fractures de l'extrémité supérieure du fémur surviennent chez l'homme et l'incidence des fractures vertébrales est égale à environ la moitié de celle des femmes.

Différents facteurs peuvent expliquer une incidence plus faible de l'ostéoporose chez l'homme. Le capital osseux maximal acquis entre 20 et 30 ans est supérieur d'environ 30 % à celui de la femme. La taille des os longs et des vertèbres est également plus élevée avec une résistance biomécanique accrue. La microarchitecture osseuse semble également mieux conservée (51). Contrairement aux femmes chez qui la carence œstrogénique est majeure

après la ménopause, la diminution des hormones mâles avec l'âge est progressive et moins marquée chez l'homme. Par ailleurs, les hommes ont une espérance de vie plus courte qui explique aussi la moindre incidence de l'ostéoporose par rapport à la femme.

5.2 Ostéoporose juvénile

Les ostéoporoses juvéniles regroupent d'une part, les fragilités osseuses constitutionnelles dominées par l'ostéogénèse imparfaite et d'autre part les ostéoporoses secondaires à une corticothérapie prolongée. Cette 2^{ème} cause est en constante augmentation du fait de l'allongement progressif de la durée de vie des enfants traités pour des cancers ou des maladies inflammatoires chroniques. Elle influence très fortement leur qualité de vie(52).

Le groupe des ostéoporoses primitives de l'enfant comporte les ostéogénèses imparfaites [OI], l'ostéoporose juvénile idiopathique à la période de l'adolescence et quelques causes extrêmement rares, le plus souvent syndromiques.

5.2.1 L'ostéogénèse imparfaite

Est une affection héréditaire très hétérogène. Rare (1/20 000 à 1/60 000 naissances vivantes), elle est le plus souvent liée à un déficit ou à une synthèse anormale de collagène de type I, constituant essentiel de la matrice osseuse. La maladie se caractérise par une fragilité osseuse importante liée à une ostéoporose généralisée et responsable de fractures ou de déformations osseuses survenant à l'occasion de traumatismes minimes. Suivant la classification de Silence établie en 1979 sur des critères cliniques et d'hérédité, on distingue les formes létales (type II), postnatales sévères (type III) et postnatales modérées (type I et IV). Rauch et Glorieux(52) ont étendu cette classification en y ajoutant les types V, VI et VII qu'ils ont pu différencier par l'analyse histologique de biopsies osseuses. Beaucoup plus rares, il semblerait que ceux-ci ne soient pas en rapport avec des mutations du collagène de type I. La transmission de l'OI est le plus souvent autosomique dominante, mais il existe des formes récessives et les mutations de novo sont fréquentes. Le pronostic des OI est très variable d'une forme à l'autre, mais une meilleure prise en charge à la fois orthopédique et médicale avec l'utilisation des bisphosphonates a amélioré leur évolution et surtout la qualité de vie des patients.

5.2.2 L'ostéoporose juvénile idiopathique

L'ostéoporose idiopathique juvénile est une affection rare survenant habituellement avant le début de la puberté à un âge moyen de 7 ans (53). Les garçons sont touchés autant que les

filles. Cette affection d'origine inconnue débute chez un préadolescent antérieurement sain et sans antécédents familiaux particuliers. Elle se manifeste par des douleurs rachidiennes mécaniques révélant une cyphoscoliose ou des tassements vertébraux et par la survenue de fractures électivement métaphysaires après traumatismes minimes. Les radiographies confirment l'existence d'une ostéoporose généralisée, de tassements vertébraux, de déformations, mais la voûte crânienne est normale. L'évolution se fait vers la rémission spontanée en 2 à 4 ans mais il peut persister des déformations séquellaires. Cette affection, bien que classique reste rare. Des fractures d'âges différents chez un nourrisson ou un enfant, peuvent faire penser au syndrome de Silverman(53).

Les études histomorphométriques osseuses réalisées au cours de l'ostéoporose idiopathique juvénile ont montré une diminution du taux de formation osseuse liée à un défaut de recrutement de nouvelles unités de remodelage osseux associé à une diminution de la formation osseuse ostéoblastique (53). Aucune augmentation de la résorption osseuse ostéoclastique n'a été observée. Ces anomalies du remodelage osseux ne concerneraient que l'os trabéculaire. L'insuffisance de la formation osseuse pourrait être responsable d'une incapacité du tissu osseux à s'adapter à l'augmentation des contraintes mécaniques au cours de la croissance, expliquant ainsi la survenue des fractures.

5.3 Ostéoporoses secondaires

L'ostéoporose est dite secondaire lorsqu'elle est la conséquence de traitements médicamenteux ou de maladies. Elle est alors souvent multifactorielle. De nombreuses maladies sont associées à une ostéopénie-ostéoporose et à une augmentation du risque de fracture. En particulier l'ostéoporose cortico-induite (OCI) de part sa fréquence semble la plus fréquente (Tableau 2).

Endocrinopathies	<ul style="list-style-type: none"> Hypercorticisme Hypogonadisme Hyperparathyroïdie Adénomes hypophysaire à prolactine Hyperthyroïdie Diabète insulino-dépendant Acromégalie
Maladies inflammatoires et systémiques	<ul style="list-style-type: none"> Rhumatismes inflammatoires chroniques (polyarthrite rhumatoïde , spondylarthropathies ...) Mastocytoses ...
Maladies digestives	<ul style="list-style-type: none"> Maladie de Crohn

	Gastrectomie Résections intestinales étendues Entéropathies inflammatoires Malabsorptions, malnutritions Hépatopathies chroniques sévères
Néoplasies	Myélome multiple Cancers métastatiques Chimiothérapie antinéoplasique
Maladies génotypique	Maladie de Lobstein (ostéogénèse imparfaite) Maladie du tissu collagène ou élastique Homocystinurie Hémochromatose
Médicaments	Corticoïdes Agonistes de la GnRH Hormones thyroïdiennes à forte doses Héparine en traitement prolongé Inhibiteurs de l'aromatase Lithium Antidépresseurs

Tableau 2 : Principales étiologies de l'ostéoporose secondaire. (45)

6. Corticothérapie et ostéoporose

L'ostéoporose cortisonique est la plus fréquente des ostéoporoses secondaires et la première cause d'ostéoporose chez l'adulte jeune. L'importance d'une corticothérapie prolongée (supérieure ou égale à trois mois) passée ou en cours, dans le risque de fragilité osseuse d'un individu est illustrée par sa place parmi les facteurs de risque de fracture retenus par l'OMS (54). La fréquence d'utilisation de la corticothérapie, d'efficacité indiscutable dans de nombreuses maladies, les progrès réalisés dans la compréhension de sa physiopathologie, et les possibilités thérapeutiques actuelles justifient les recommandations de prévention et traitement des conséquences osseuses des corticothérapies prolongées.

La perte osseuse induite par les GC est précoce et rapide, significative dès les six premiers mois de traitement. La perte osseuse prédomine sur le secteur trabéculaire par rapport à l'os cortical, ce qui explique la fréquence des fractures vertébrales et costales. Une méta-analyse de 56 études transversales et de dix études longitudinales a montré que la perte osseuse débute rapidement après l'initiation du traitement pour atteindre 5 à 15 % au cours de la première année (55). L'intensité de la perte osseuse diminue ensuite, mais reste significative au-delà de

la première année. Son amplitude dépend de la dose et de la durée du traitement cortisonique et donc essentiellement de la dose cumulée (55).

La physiopathologie de l'ostéoporose cortisonique est résumée dans la Figure 29 :

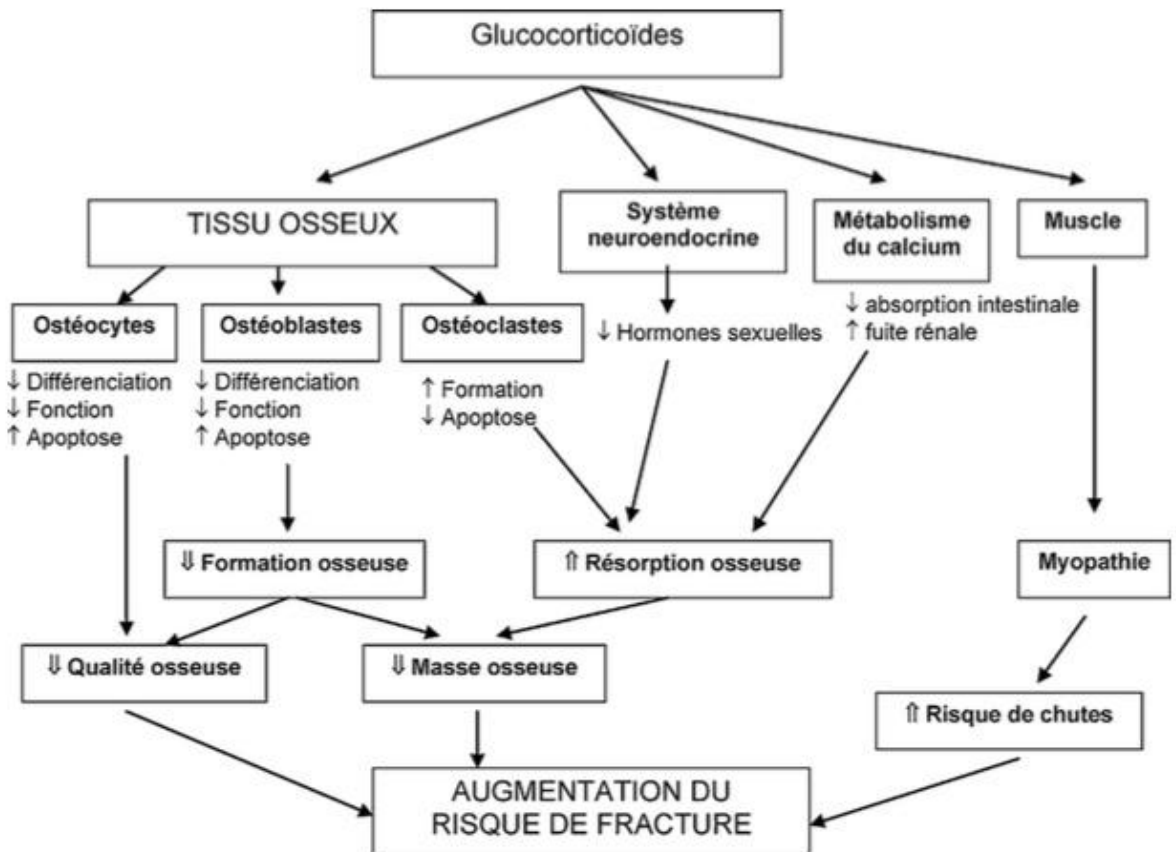


Figure 29 : Physiopathologie de l'ostéoporose cortisonique(56). Adapté d'après Canalis et al.

7. Obésité et ostéoporose

Il est communément admis qu'un faible indice de masse corporelle (IMC) constitue un facteur de risque classique de fracture. Ainsi, toute diminution d'une unité de l'IMC est à l'origine d'une réduction modérée (mais significative) du risque de fracture. La réduction est plus conséquente si on s'intéresse aux fractures par fragilité. Elle est encore plus importante si on se focalise sur les fractures de la hanche. En revanche, De Laet et al. (57) après ajustement pour la densité minérale osseuse (DMO), ont montré que cette association disparaît. Il est maintenant bien établi que l'effet protecteur du poids sur le risque de fracture ne se manifeste que jusqu'à un certain seuil d'IMC (25 kg/m²) qui correspond à la définition du surpoids. Au-delà de ce seuil, l'incidence fracturaire ne varie plus. Après ajustement pour la DMO, il semble même qu'un IMC supérieur à 30 kg/m² puisse être à l'origine d'une augmentation du

risque de fracture. Les publications indiquant que l'obésité n'est pas protectrice quant à l'apparition de fractures par fragilité osseuse sont récentes. L'analyse des données (qui ne sont pas d'ailleurs pas toutes unanimes) est complexe dans la mesure où l'effet de l'obésité est différent en fonction du siège de la fracture. Chez la femme, l'obésité semble associée à une augmentation du risque de fracture du tibia (extrémité supérieure et inférieure), de la diaphyse fémorale ainsi que de l'extrémité supérieure de l'humérus. A contrario, l'obésité apparaît protectrice en ce qui concerne les fractures du poignet, de la hanche et du bassin(58). Le sexe est également un élément important à prendre en considération. Ainsi chez l'homme, l'obésité (après ajustement pour la DMO) constitue un facteur de risque de fracture de hanche. Pour les fractures vertébrales, l'obésité serait un facteur protecteur chez l'homme mais favorisant chez la femme. En termes mécanistiques, beaucoup d'inconnues demeurent. Au-delà des contraintes mécaniques qui peuvent constituer une explication évidente pour comprendre l'augmentation de l'incidence de certaines fractures chez les obèses, il faut prendre en considération la complexité du tissu adipeux. Ce véritable organe endocrine considéré jusqu'à présent comme un simple réservoir est doué de propriétés métaboliques conséquentes. Il est notamment capable de sécréter des adipokines. La plus connue d'entre elles est la leptine(29). La leptine mesurée en périphérie a plutôt un effet protecteur au niveau osseux. Une autre adipokine, l'adiponectine, pourrait également être impliquée dans le métabolisme osseux avec une action opposée par rapport à la leptine. En outre, l'obésité appartient comme d'autres affections à la catégorie des maladies chroniques à l'origine d'une inflammation évoluant à bas bruit. Ainsi, la sécrétion par le tissu adipeux de cytokines pro-inflammatoires (IL1, IL6 et TNF notamment) pourrait constituer une piste explicative intéressante(59).

8. Foie et os

Du fait du métabolisme hépatique de la vitamine D qui est transformée en 25-OH vitamine D dans le foie avant d'être transformée en 1-25-OH vitamine D dans le rein (32), il est classique de considérer que les perturbations du métabolisme hépatique entraînent un déficit en cette vitamine D et potentiellement une ostéomalacie (60). De même l'ostéoporose est une complication fréquente des hépatopathies chroniques telles la cirrhose biliaire primitive, la maladie alcoolique, les hépatites virales ou leur traitement, l'hémochromatose génétique, la transplantation hépatique la cirrhose... Certains facteurs de risque sont directement liés à la maladie hépatique elle-même (cholestase chronique, diminution de production de facteurs de croissance comme l'insulin-like growth factor-1 [IGF- activation de

la résorption osseuse [receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL)], surcharge en fer, etc.) ; d'autres sont communs à la population générale. Les deux s'ajoutent.

Le risque fracturaire est augmenté ce qui fait la gravité de l'atteinte osseuse. Outre le recensement des antécédents fracturaires et l'évaluation des facteurs de risque d'ostéoporose, la prise en charge thérapeutique commence par la prise en charge de la maladie causale, mais également par des apports recommandés en calcium, alimentaire si possible, le maintien d'un taux de calcidiol (25 [OH] vitamine D) supérieur à 30 ng/ml et l'emploi de médicaments antiostéoporotiques(61).

9. Rein, glandes salivaires et os

Le maintien de la calcémie et de la phosphatémie dans des valeurs étroites est le résultat d'une régulation complexe faisant intervenir des échanges entre le rein, l'intestin et le squelette. Le rein joue un rôle essentiel dans cette régulation en permettant à court terme un maintien de l'équilibre phosphocalcique grâce à une adaptation de l'élimination rénale du calcium et des phosphates aux apports nutritionnels. Cette adaptation est sous la dépendance d'hormones dont la forme active de la vitamine D et l'hormone parathyroïdienne(62).

L'insuffisance rénale chronique (IRC) induit des troubles précoces du métabolisme phosphocalcique qui vont progressivement induire une hyperparathyroïdie secondaire (HPT II) qui s'associe à d'autres désordres tels que l'acidose, les troubles nutritionnels, la perte de mobilité, l'inflammation chronique. Tous ces éléments ont, à des degrés divers et de façon variable, selon la sévérité de l'insuffisance rénale, des effets délétères sur le tissu osseux. Depuis la conférence consensus KDIGO (*Kidney Disease Improving Global Outcomes*) de 2009, le terme d'ostéodystrophie rénale (ODR) ne caractérise que les troubles histologiques induits, par l'IRC. Le nouveau cadre nosologique, intitulé TMO-MRC pour "Troubles Minéraux et Osseux de la Maladie Rénale Chronique" inclut, outre l'ODR, les manifestations cliniques (calcifications extrasquelettiques et fractures) et biologiques de la MRC(63).

L'hyperparathyroïdie secondaire à l'insuffisance rénale chronique dans laquelle la rétention de phosphate joue un rôle important, est un déterminant physiopathologique essentiel dans la survenue des différentes anomalies des tissus osseux et des tissus mous. Des travaux récents (Figure 30) ont aussi démontré que les dérégulations du métabolisme des phosphates et du

calcium sont fortement associées aux troubles du remodelage osseux tels observés dans l'ostéoporose, l'ostéomalacie et la dystrophie osseuse rénale(63).

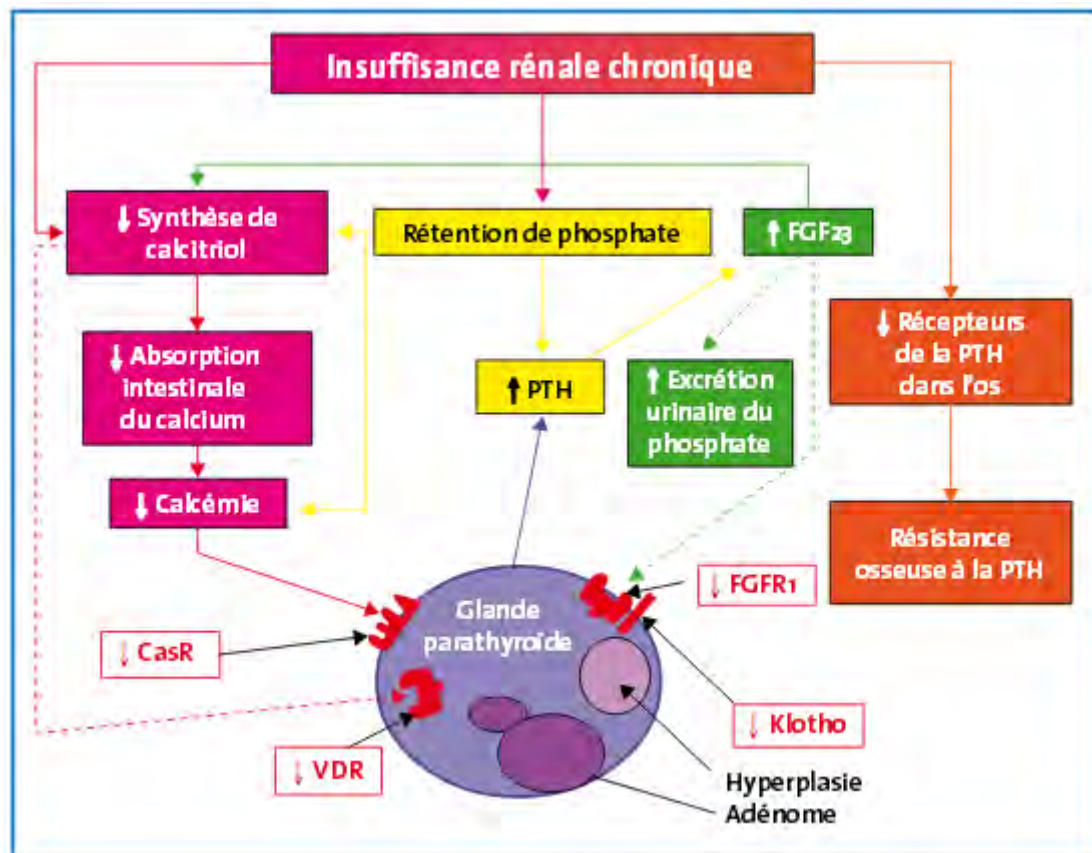


Figure 30 : **Physiopathologie de l'ostéodystrophie rénale.** Les pointillés représentent la perte de la fonction liée à l'insuffisance rénale chronique. PTH : parathormone, FGF23 : Fibroblast growth factor 23. L'expression du récepteur sensible au calcium (CaSR), du récepteur de la vitamine D (VDR) du récepteur du FGF23 (FGFR1) et de son co-récepteur Klotho par les cellules parathyroïdiennes diminue au cours de l'IRC(63).

Chez les dialysés la prévalence exacte des fractures vertébrales est mal connue, elle serait de 21 % chez les hommes hémodialysés, selon Atsumi et al. (64) l'augmentation de la prévalence des fractures non vertébrales est connue, avec un risque relatif multiplié par 5,5 à 6 selon le sexe (65).

Dans le groupe des glandes salivaires, la glande parotide est responsable à côté de la sécrétion de la salive d'une hormone endocrine la parotine. Celle-ci a un rôle majeur dans la minéralisation de la dentine, ainsi qu'une action hypocalcémiante limitée. Son intervention dans la pathogénie de la fragilité osseuse n'est pas documentée.

10. Traitement et prévention de la fragilité osseuse et de l'ostéoporose

Objectifs

Il existe deux raisons principales pour indiquer un traitement anti-ostéoporotique : la gravité des complications de certaines fractures, et le risque de récurrence fracturaire.

Le traitement de l'ostéoporose a fait l'objet de développements d'un nombre croissant de molécules de modes d'actions divers, ayant un très bon niveau de preuve d'efficacité, un bon rapport efficacité/tolérance et dont l'utilisation a été encadrée par des recommandations(17).Le traitement hormonal de la ménopause quant à lui est actuellement indiqué s'il existe des troubles climatériques importants et la durée de sa prescription est adaptée à l'évolution de ces troubles. L'existence d'alternatives thérapeutiques efficaces n'en fait plus un traitement de première intention de l'ostéoporose postménopausique (66).

La tendance actuelle partout dans le monde est le retour au « naturel », au bio, c'est-à-dire puiser de la nature ses propres nutriments et remèdes mais aussi de découvrir des drogues ciblant les molécules intracellulaires et celles impliquées dans les interactions cellulaires pour une médecine personnalisée.

Le traitement de la fragilité osseuse et de l'ostéoporose comprend plusieurs volets :

10.1 Les mesures hygiéno-diététiques

L'activité physique régulière est recommandée pour maintenir un capital osseux satisfaisant. Cela a également un effet bénéfique sur l'équilibre, le tonus musculaire et participe activement à la prévention des chutes. Le profil d'activité physique recommandée est une activité en charge, comportant des impacts au sol, par exemple la marche, à raison d'environ 30 à 60 minutes par jour.

Il convient aussi de supprimer les facteurs de risque extrinsèques comme le tabac et l'excès d'alcool(17).

10.2 Fournir des éléments constitutifs en quantité adéquate

Les protéines sont fondamentales pour le tissu osseux : outre un rôle structural (matrice collagénique), elles interviennent dans différents processus de reconnaissance et/ou d'interaction avec d'autres molécules (notamment dans la régulation du dépôt minéral).Cependant des apports inadéquats en protéines sont préjudiciables pour le fonctionnement de l'axe somatotrope, et sont notamment associés à une altération des

concentrations plasmatiques en IGF1, facteur de croissance fondamental pour le fonctionnement ostéoblastique.

Il est évident qu'une malnutrition survenant au cours de l'enfance et l'adolescence s'accompagne d'un retard de croissance et d'une diminution de la masse osseuse. Chez l'adulte, les données sont moins consensuelles. À l'autre extrême de la vie, une consommation insuffisante (avec une absorption calcique naturellement diminuée du fait de l'âge), d'ailleurs souvent associée à l'apparition d'une sarcopénie, est responsable d'une fragilité osseuse, et donc d'une accélération de l'atteinte du seuil pathologique(2).

Le calcium est l'élément déterminant de la qualité du squelette parce qu'il lui confère ses propriétés de rigidité. Les principales sources de calcium sont d'origine alimentaire. Le lait et les produits laitiers servent de référence pour la biodisponibilité du minéral et couvrent, en moyenne, 70 % des apports. Si les produits laitiers font l'objet d'une polémique depuis quelques années, les données récentes de la littérature démontrent l'absence de fondement des arguments avancés par les détracteurs(2)

Les eaux de boissons, les fruits, les légumes et les céréales peuvent contribuer secondairement aux apports.

Toute calcithérapie doit être associée à une prescription de vitamine D qui intervient dans le mécanisme de transport actif du minéral à travers la paroi entérocytaire. Les aliments pourvoyeurs de vitamine D sont les huiles de poissons et les poissons gras.

Même si une supplémentation calcique n'est pas forcément un gage de majoration du capital osseux, toute carence est extrêmement délétère. Il ressort, en effet, d'une étude qu'un défaut de consommation de produits laitiers pendant l'enfance est associé à une réduction significative du contenu minéral et de la taille du squelette avant 50 ans et, après 50 ans, à une augmentation importante du risque fracturaire (67) Si la non-consommation de produits laitiers intervient plus tardivement, les conséquences sont moins dramatiques. En revanche, chez le sujet âgé, le bénéfice d'une calcithérapie, associée à une supplémentation en vitamine D est réel.

Le phosphore joue un rôle important dans la physiologie du squelette. Sa consommation simultanée avec le calcium permet de réduire la calciurie en augmentant la réabsorption tubulaire, indépendamment de l'ingestion calcique. La consommation de phosphore dans l'alimentation courante est toujours très excédentaire par rapport aux recommandations, et donc le problème posé est plutôt celui du risque d'un surdosage(2).

10.3 Fournir des nutriments/micronutriments potentiellement protecteurs

- les phyto-oestrogènes qui sont des composés végétaux (particulièrement concentrés dans le soja) qui expriment des activités hormonales. Ces molécules ouvrent des perspectives intéressantes pour la prise en charge de la femme ménopausée, dans un objectif de prévention de l'ostéoporose. La mise en évidence d'une distribution géographique mondiale différentielle de l'incidence de l'ostéoporose est à l'origine de l'hypothèse du rôle protecteur des phytoestrogènes, puisque la forte consommation de produits dérivés du soja dans les pays asiatiques (où la pathologie est peu représentée) a été incriminée, entre autres, pour expliquer cette disparité(2).

Ces observations sont confortées par des travaux expérimentaux randomisés de Morabito(68) et de Marini (69) qui montrent que l'effet combiné d'une phytoestrogène, de calcium et de vitamine D à des femmes ménopausées ostéopéniques exercent des effets bénéfiques, qui s'expliquent notamment par une optimisation du ratio ostéoprotégérine/*receptor activator of NK- β ligand*(OPG/RANKL).

Isoflavones (mg/kg)	
Graines de soja	1 000-2 000
Pois, lentilles	1-25
Noix	2,6
Fruits, légumes	1
Café	0,5
Bière	0,02-0,05
Lignanes (mg/kg)	
Farine de lin	527
Lentilles	18
Blé	5
Ail	4
Carotte	3,5
Maïs	2
Poire	2
Banane	1
Coumestans (mg/kg)	
Luzerne	47

USDA : United States Department of Agriculture. Consommation quotidienne moyenne : pays asiatiques : 40-100 mg/j ; pays occidentaux : omnivores : 1-2 mg/j, végétariens : 3-10 mg/j.

Tableau 3 : Contenu en phytoestrogènes de plantes de fruits et de graines(2)

- Nutriments dotés de propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires

La carence oestrogénique consécutive à la ménopause s'accompagne d'une inflammation chronique à bas bruit et d'un stress oxydant (70) qui sont les dénominateurs communs à différentes pathologies dégénératives liées à l'âge.

Il ya une communication entre le système immunitaire et les cellules osseuses on parle « d'ostéo-immunologie » (42).

Il existe une relation très étroite entre inflammation et stress oxydant qui, selon de nombreuses théories, pourrait contribuer au processus de vieillissement, et donc à de nombreuses pathologies liées à l'âge (théorie des radicaux libres).

Certains nutriments étant dotés de propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires, l'état nutritionnel joue inévitablement un rôle fondamental dans l'immunocompétence de la personne âgée et il est probable que la longévité puisse être améliorée en optimisant l'alimentation (mécanisme d'ailleurs incriminé dans les effets bénéfiques du régime méditerranéen). La manipulation de l'équilibre redox et du statut inflammatoire est effectivement possible par l'administration de vitamines (A et caroténoïdes, des Vitamines du groupe B et E, de la vitamine C et K) (2), ainsi que des micronutriments, d'éléments traces et des polyphénols.

Les polyphénols suscitent un intérêt croissant en raison de la reconnaissance de leur implication probable dans la prévention de diverses pathologies associées au stress oxydant. Plus de 4 000 de ces composés ont été identifiés jusqu'à présent dans le règne végétal et certains sont retrouvés dans nos aliments (fruits, légumes, céréales, boissons) (Figure 31).

Les vertus de ces composés phénoliques sont admises pour la cible cardiovasculaire et le cancer ; leur impact sur le métabolisme osseux n'a été que très peu étudié.

L'effet ostéoprotecteur des polyphénols a été mis en évidence chez la rate ovariectomisée(71).

De même certains lipides ayant des fonctions antioxydantes et anti-inflammatoires est aussi un paramètre supplémentaire à considérer dans la gestion nutritionnelle du capital osseux.

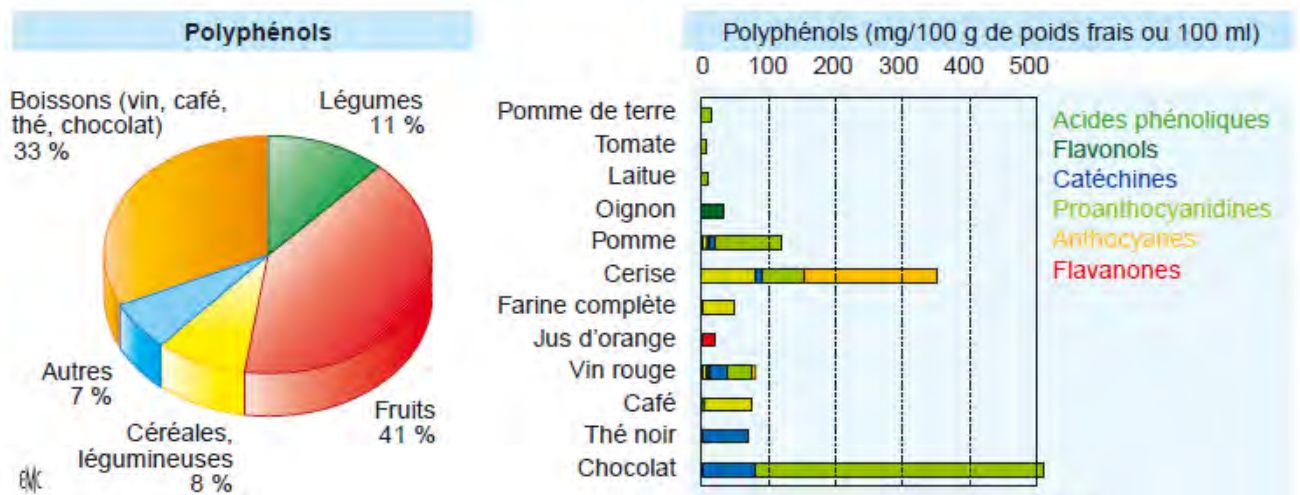


Figure 31 : Polyphénols dans l'alimentation(2)

D'autres substances sont intéressantes ; une flavanone présente dans les agrumes, principalement dans la peau d'orange, ou l'oleuropéine issue des produits de l'olivier. Les pruneaux (riches en composés phénoliques) ont également démontré des vertus intéressantes pour le squelette(72). À l'heure actuelle, les seules données cliniques disponibles dans ce domaine concernent la consommation de thé (73).

Par ailleurs des travaux sur le rat soumis à un régime contenant du mil à chandelle ont montré une activité anti-inflammatoire et antioxydante (3) de ses grains.

Figure récapitulative de la relation entre aliments et métabolisme osseux (Figure 42)

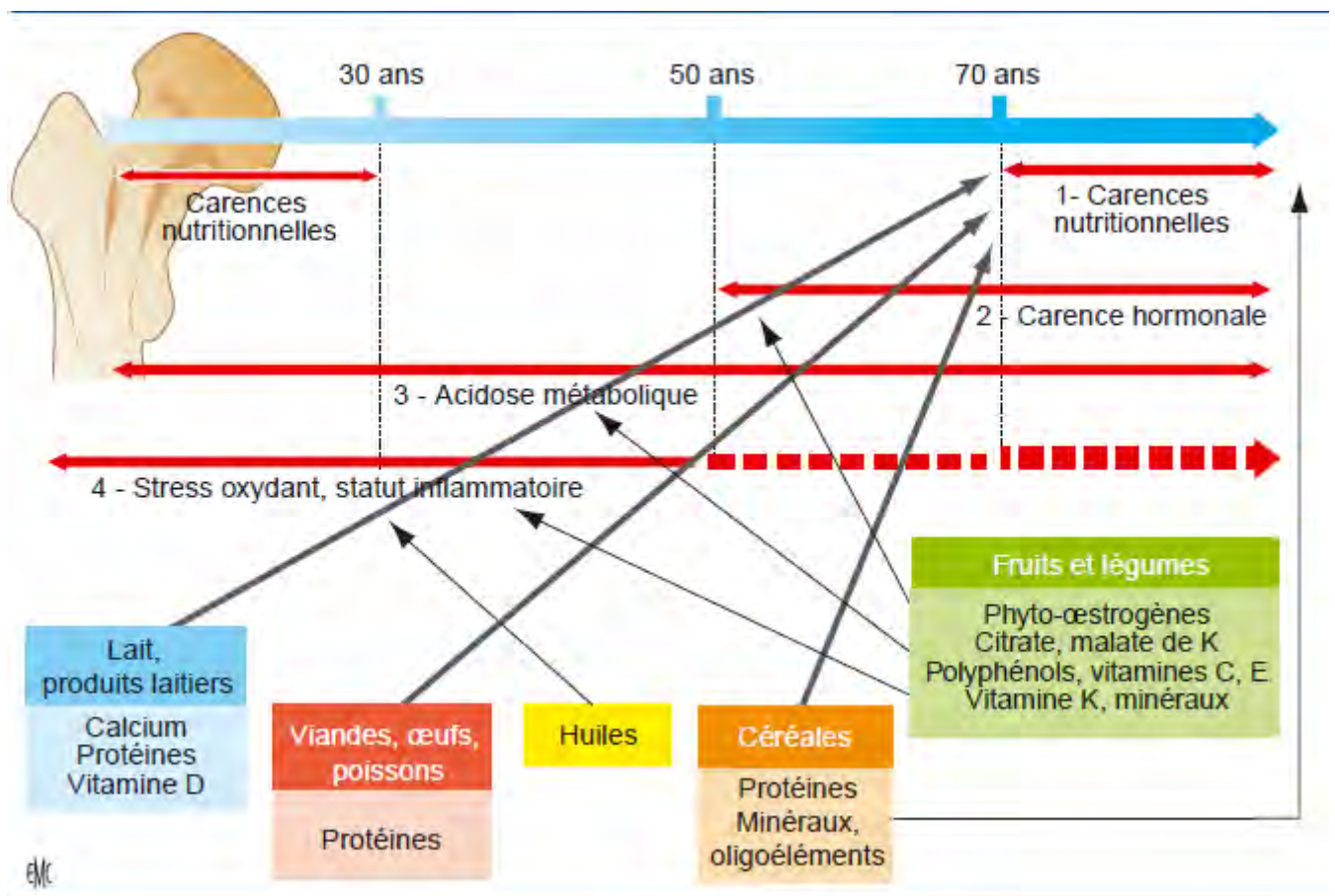


Figure 32 : Relations entre aliments et métabolisme osseux (42)

10.4 Le traitement médicamenteux

Les classes de médicaments aujourd'hui sont divisées selon leur action sur la résorption, sur la formation ou sur les deux. (38)

10.4.1 Traitements antirésorptifs

Modulateurs sélectifs des récepteurs estrogéniques (SERM)

Le raloxifène est actuellement disponible pour le traitement de l'ostéoporose post ménopausique.

Il diminue le remodelage osseux et prévient la perte osseuse lombaire et fémorale chez les femmes récemment ménopausées. Il augmente de façon modeste la densité minérale osseuse

(DMO) lombaire et fémorale à distance de la ménopause. Il réduit le risque de fractures vertébrales, mais pas celui des fractures périphériques, en particulier du col fémoral. Sa tolérance générale est bonne. Une récente étude a montré un effet préventif sur le cancer du sein invasif(74)

Bisphosphonates

Les bisphosphonates sont des analogues stables des pyrophosphates qui s'incorporent et s'accumulent donc facilement dans la matrice osseuse. Leur action contre la perte osseuse passe par une altération de la fonction ostéoclastique. Il existe aujourd'hui cinq bisphosphonates disponibles sur le marché.

L'étidronate (Didronel®), le risédronate (Actonel®), l'alendronate (Fosamax®), l'ibandronate (Bonviva®), et l'acide zolédronique (Aclasta®) (4).

Parmi les travaux réalisés sur l'alendronate, l'étude expérimentale que nous menons vise à montrer l'intérêt du mil à chandelle qui présente des propriétés équivalentes à celles de cette molécule

Le choix entre les différentes molécules se fait en fonction du site de fracture et adapté à la préférence des patients. Ces molécules sont généralement bien tolérées de très rares cas d'ostéonécrose aseptique de la mâchoire ont été rapportés avec les bisphosphonates.

10.4.2 Traitements ostéoformateurs

Tériparatide (Forsteo®)

Il s'agit du fragment 1-34 de l'hormone parathyroïdienne humaine. Le tériparatide est un puissant agent ostéoformateur, il est indiqué chez des femmes et les hommes ayant une ostéoporose sévère ou une ostéoporose induite par des traitements cortisoniques, avec au moins deux antécédents de fractures vertébrales. (75)

10.4.3 Découplants positifs

Ranélate de strontium (Protélos®)

Le ranélate de strontium a la particularité de favoriser la formation osseuse, d'une part, et de diminuer la résorption, d'autre part. Ces propriétés uniques permettent un découplage du remodelage osseux avec un rééquilibrage au bénéfice de l'anabolisme osseux(17).

Les nouveaux traitements (74, 76)

Anticorps anti-RANKL Denosumab.

Ce médicament fait entrer l'ostéoporose dans le domaine des biothérapies. Le denosumab bloque l'action du RANKL et entraîne donc une diminution de la résorption osseuse.

Anti-cathepsine K : L'odanacatib : La cathepsine K étant une enzyme lysosomale qui participe à la résorption osseuse par dissolution de la matrice protéique.

Anticorps anti-sclérostine.

La sclérostine, produit du gène SOST est un puissant inhibiteur de la formation osseuse par son action inhibitrice de la voie de signalisation Wnt/LRP5-6/Frizzled.

Chapitre III: Le mil à chandelle

Les plantes médicinales sont de plus en plus utilisées aussi bien en médecine traditionnelle que associées à la médecine moderne, de plus cette utilisation n'est plus l'apanage des pays pauvres mais aussi dans les pays riches puisque l'utilisation des plantes est le moyen le plus sain et le plus proche de la nature. La promotion de l'usage des plantes médicinales et leur intégration dans le système de santé, font partie des priorités de l'OMS. En France depuis le décret du 15 juin 1979, la liste des plantes « libérées » c'est-à-dire susceptibles d'être utilisées comme plantes médicinales s'est considérablement allongée (77).

L'utilisation du Mil à chandelle (*Pennisetum glaucum* (L.)) est largement répandue dans la pharmacopée marocaine. Ses effets pharmacologiques s'étendent à plusieurs affections et maladies comme les maladies de l'os, le diabète, la maladie ulcéreuse,... Cependant peu de travaux ont été faits pour démontrer scientifiquement l'impact réel de cette plante médicinale.

1. Taxonomie du mil à chandelle

Le mil à chandelle, mil pénicillaire, ou petit mil (en anglais "pearl millet", "bulrush millet", "cattail millet", en arabe illane (دخن , إبلان)) herbe annuelle du genre *Pennisetum*. (*Pennisetum glaucum*(L.) R. Br.) est l'une des céréales les plus tolérantes à la sécheresse. Il est cultivé dans des régions où la pluviométrie se situe entre 150 et 800 millimètres par an (78).

Le mil est mieux adapté que la plupart des autres cultures aux sols secs et infertiles. Il est souvent cultivé dans des conditions extrêmes, températures élevées, précipitations faibles et irrégulières, saisons brèves, sols acides, très peu fertiles et ayant une faible capacité de rétention en eau (79). Le mil est cultivé pour la production de grains, essentiellement en Inde et en Afrique de l'Ouest, ce qui constitue de loin son utilisation la plus importante. Il est cultivé pour la production de fourrage, aux Etats-Unis, en Australie et en Afrique du Sud,

Le terme « mil » regroupe un ensemble de graminées alimentaires annuelles qui ont pour caractéristique commune la petitesse de leurs grains.

Les espèces les plus importantes sont le mil à chandelle, l'éleusine, le millet commun et le millet des oiseaux. Le mil à chandelle compte pour près de la moitié de la production mondiale du mil. C'est l'espèce la plus importante du point de vue des superficies cultivées et

de la sécurité alimentaire, car dans plusieurs régions d'Afrique et d'Asie c'est l'une des rares cultures qu'on peut produire.

Le genre *Pennisetum* comporte environ 140 espèces et sous espèces (80). Les quatre formes cultivées du mil à chandelles sont Typhoides (quel'on retrouve principalement en Inde et en Afrique), Nigritarum (prédominant dans l'Est du Sahel), Globosum (prédominant dans l'Ouest du Sahel) et Leonis (prédominant sur la côte ouest africaine) (81; 82; 83).

Le rachis cylindrique de la chandelle et la présence d'une touffe de poils sur le haut des étamines (pénicille) caractérisent l'espèce au sein du genre (84). La structure et la morphologie de la feuille et du grain permettent de classer le *Pennisetum glaucum*. (tableau

4) : **Tableau 4. Taxonomie de *Pennisetum glaucum* (L.)**

Classification	Nom scientifique et nom commun
Règne	<i>Plantae</i> – Plantes
Sous-Règne	<i>Tracheobionta</i> – Plantes vasculaires
Super-Division	<i>Spermatophyta</i> – Plantes à graines
Division	<i>Magnoliophyta</i> – Plantes à fleurs
Classe	<i>Liliopsida</i> – Monocotylédones
Sous – Classe	<i>Commelinidae</i>
Ordre	<i>Cyperales</i>
Famille	<i>Poaceae</i> – Famille d'herbe
Genre	<i>Pennisetum</i> Rich. ex Pers – herbe de fontaine
Espèces	<i>Pennisetum glaucum</i> (L.) R. Br. – petit-mil

L'Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture (FAO) estime que les pays en développement surtout en Afrique et en Asie produisent 94% de la production mondiale du mil, estimée à 28 millions de tonnes. Le mil pénicillaire compte pour près de la moitié de la production mondiale de mil (FAO) (85).

A l'échelle du continent Africain, la production de mil est estimée à 70% et elle provient de l'Ouest dont les principaux pays sont, par ordre d'importance décroissante : le Nigeria, le Niger, le Burkina, le Tchad et le Mali, la Mauritanie et le Sénégal (78). L'Est assure également une grande partie de la production notamment le Soudan et l'Ouganda.

En Asie, la culture de mil se limite presque exclusivement à deux pays, l'Inde et la Chine (85). En Inde, le mil est classé au quatrième rang des céréales ; sa culture est importante dans les Etats de Rajasthan, du Gujerat et de l'Haryana(78).

2. Morphologie

Les fruits des céréales se présentent sous formes de grains qui ont en commun certaines caractéristiques avec cependant quelques spécificités(86). Pour la FAO, les principales caractéristiques des grains de ces céréales sont (85):

- une enveloppe externe formée de fibres cellulosiques dépourvues de valeurs nutritives pour l'être humain ;
- le péricarpe et le testa, deux couches fibreuses qui contiennent peu d'éléments nutritifs ;
- l'aleurone qui est riche en protéines, vitamines et minéraux ;
- l'embryon ou germe, riche en nutriments, est composé de la plumule et de la radicule attachées au grain par le scutellum ;
- l'endosperme ou albumine : il représente plus de la moitié du grain et est composé essentiellement d'amidon.



Figure 33. Culture du mil à chandelle

3. Composition des grains du mil

3.1. Composition chimique

Le mil et le sorgho, que certains auteurs classent parmi les millets, sont des genres possédant beaucoup de caractéristiques en commun. Il a été démontré que tous les sorghos (*Sorghum*

bicolor (L.)) contiennent des composés phénoliques et beaucoup de flavonoïdes (87). D'autres composés potentiellement bénéfiques pour la santé humaine ont été identifiés chez les sorghos et les mils, des tannins, des acides phénoliques, des anthocyanins, des phytosterols et des policosanols(88). La composition chimique est présentée dans le tableau 5 (89).Le contenu en acides aminés du mil à chandelle diffère d'une partie à l'autre de la plante, ainsi qu'en fonction des différents stades de sa croissance (90).

Tableau 5. Composition chimique des grains du mil à chandelle (89)

Nutriment	Grains du millet			
	Mil variété A (Adeola O 1995)	Millet variété B	Millet C	Mils (Awika JM 2004)
Matière sèche %	89,08	90,12		
Protéine brute %	10,03	12,06		11,8
Energie brute %	4132,00	4307,00		353,0
Fibre %	3,84	3,62		1,9
Minéraux mg/kg				
Zinc	35,00	43,00	0,004	2,0
Phosphore	3148,00	3343,00	0,00	339,0
Manganèse	11,00	12,00	0,147	0,8
Fer	40,00	51,00	0,003	9,80
Magnésium	1239,00	1351,00		114,0
Calcium	153,00	208,00	0,211	37,0
Cuivre	5,00	6,00		0,5 mg
Acides aminés %				
Acide aspartique	0,83	0,91		
Acide glutamique	1,90	2,16		
Serine	0,49	0,55		
Glycine	0,27	0,29		
Histidine	0,38	0,39		
Arginine	0,56	0,63		
Thréonine	0,42	0,44		
Alanine	0,79	0,91		

Proline	0,65	0,74	
Tyrosine	0,38	0,41	3,0
Valine	0,58	0,65	4,9
Méthionine	0,23	0,23	1,8
Leucine	1,03	1,16	3,2

Les mils contiennent deux types d'acides phénoliques isolés : l'acide hydroxycinnamique et l'acide hydroxybenzoïque. L'acide hydroxybenzoïque inclut l'acide p-hydroxybenzoïque, vanilique, syringique et l'acide protocatéchique, alors que l'acide hydroxycinnamique inclut le couramique, l'acide caféique et sinapique (91).

Par les traitements industriels les grains du mil contiennent plus de 27 à 32% de protéines avec une concentration élevée en acides aminés, une concentration 2 fois supérieure en graisse et une importante énergie brute en comparaison à celle des autres céréales notamment le maïs et le sorgho(92). Environ 75% de leur matière grasse sont des acides gras polyinsaturés (93). L'oméga-3 et l'acide linoléique (C18 :3n-3) (LNA) représente 4% des acides gras totaux des huiles du mil (94). Le mil renferme des huiles riches en acide linoléique ce qui explique sa densité supérieure en acides polyinsaturés (n-3) comparée à celle de maïs qui représente 0,9% en acides gras totaux (91)

.Tableau6. Analyse de la composition approximative du Millet Marocain

Eléments	Valeur nutritionnelle(%)	FAO
Protéines	10,84 ± 0,22	11,8
NDF	17,08 ± 1,47	N,r
ADF	3,81 ± 0,29	N,r
ADL	0,58 ± 0,07	N,r
Cellulose	2,22 ± 0,07	N,r
Graisse	6,45 ± 0,12	4,8
Humidité	10,99 ± 0,15	N,r
Ca (mg/100g)	211,01 ± 5,12	42,00
Fe	30,11 ± 2,11	11,00
Mg	174,04 ± 3,12	N,r
Zn	40,19 ± 1,06	N,r

NDF : fibres insolubles dans les détergents neutres, ADF : fibres insolubles dans les détergents acides, ADL : fibres insolubles dans les détergents lignines ; Ca : calcium, Fe : fer, Mg : magnésium, Zn : zinc.

L'analyse comparative du mil à chandelle commercialisé au marché marocain et celui de la Tunisie (tableau7) montre quelques différences majeures, qui pourraient être significatives pour cette espèce. Le mil d'origine Tunisienne est hautement riche en acide palmitique et en acide linoléique. En revanche, le mil commercialisé au Maroc a des teneurs élevées en acide oléique.

Tableau 7. Composition en acides gras (%) de l'huile du Millet Marocain (95)

Acide gras du mil	Acide gras du mil Marocain (%)	Acide gras du mil Tunisien (%) (Ben Mustapha M 2014)
Acide Palmitique	0,63	17,64
Acide Palmitoleique	0,03	N,r
Acide Stéaritique	4,66	3,89
Acide Oléique	38,39	30,82
Acide Linoléique	36,61	45,78
Acide Linoléique	2,06	1,84
Acide Arachidique	0,90	N,r
Acide gadoléique	0,27	N,r

3.2. Activités biologiques

De nombreuses études ont montré que les graines de céréales contiennent des composés variés tels que les β -glucanes, les lignanes et les phytostérols qui jouent un rôle important dans la prévention des cancers du sein, de la prostate, du cancer colorectal et d'autres cancers (91). Dans cette catégorie, on trouve également le mil à chandelle.

Les grains du mil grâce à leur richesse en phénols et en flavonoïdes sont dotés d'effets antioxydant et anti-inflammatoire manifestes (3). Les activités anti-oxydantes et anti-inflammatoires sont essentielles dans le traitement et la prévention de la sénescence, des cancers, de l'ostéoporose... L'activité anti-oxydante des composés phénoliques des grains des mils jouent un rôle important contre la peroxydation liposomique induite par la lumière UVA (96). Les bioactivités de ces plantes peuvent être attribuées aux différents composants phénoliques et des ions ferreux trouvés dans les extraits des grains du mil à chandelle (96).

Les extraits des grains du mil montrent une grande efficacité pour réduire le taux de glycémie. Nani et al. ont rapporté que la consommation des grains entiers des millets montrent un intérêt thérapeutique contre l'athérosclérose, le choc ischémique, le diabète et l'insulino-résistance(97), avec un effet hypothyroïdien(98). De plus, l'apport élevé en fibres céréalières est constamment associé à une diminution du risque de développer le diabète (99).

Les acides gras polyinsaturés (n-3) jouent un rôle important dans les mécanismes physiologiques, y compris l'agrégation plaquettaire, l'accumulation du cholestérol LDL et le système immunitaire. Les acides gras oméga-3 pourraient jouer un rôle bénéfique dans la prévention et le traitement des maladies cardiovasculaires, des diabètes, d'arthrites et certains types de cancers. Les grains du mil contiennent des proportions élevées en fibres alimentaires solubles(91), qui inhibent la scission de l'ADN, l'oxydation de liposomes et la prolifération de cellules HT-29 d'adénocarcinome (96).

Il ressort de notre revue de la littérature concernant le mil qu'il n'y fait pas mention de son activité sur l'os et la fragilité osseuse. Cependant du fait de sa grande richesse en phytosterols auxquels s'apparentent les phytoestrogènes présents dans le soja ; Il peut par conséquent lui être comparé. En effet, les enquêtes épidémiologiques dans les pays asiatiques où la consommation du soja est élevée, l'incidence de l'ostéoporose est faible(1). Aucune enquête épidémiologique n'a été menée dans les pays à forte consommation du mil pour établir un corollaire avec le soja, mais nous pensons malgré cela que ces observations corroborent les hypothèses concernant l'intérêt du mil comme anti-ostéoporotique.

Deuxième partie: Etude expérimentale

Introduction

Dans la deuxième partie de notre thèse, nous présentons ci –après les travaux que nous avons réalisés.

Dans les deux premiers articles que nous présentons , le principe de base a été le même, il s'agit d'évaluer chez le rat ostéoporotique l'effet de l'extrait aqueux du mil à chandelle ou pennisetum glaucum en comparant cet effet avec un antiostéoporotique connu (un biphosphonate: l'alendronate).

Pour réaliser cela, nous avons procédé de la façon suivante :

Les rats ont été soumis à un régime hypercalorique, associé aux glucocorticoïdes.

Le régime hypercalorique et le traitement cortisonique ont pour objectif de provoquer chez le rat la fragilité osseuse corollaire chez l'homme de l'ostéoporose. Ainsi le régime hypercalorique dénommé « cafétéria » riche en hydrates de carbone et en graisses a pour but d'induire l'obésité chez ces rats. Certes, l'obésité pourrait être un facteur de résistance contre les fractures jusqu'à un certain seuil, mais il est indéniable que lorsque l'IMC dépasse le seuil de 30Kg/m²(57), l'obésité devient synonyme de fragilité osseuse.

Le traitement cortisonique que nous avons rajouté au régime avait pour but de renforcer les effets délétères de ce régime sur l'os, de telle sorte que la fragilité osseuse devienne tout à fait patente. En effet, actuellement, tous les auteurs sont unanimes quant aux effets néfastes des traitements corticoïdes au long cours sur l'architecture osseuse et le remodelage de l'os (54,55).

Après la préparation de l'extrait aqueux du mil, nous avons donc procédé à son administration aux rats et comparé ses effets par rapport aux groupes ayant reçu l'alendronate. Pour cela nous avons suivi rigoureusement les protocoles expérimentaux indiqués et bien détaillés dans ces deux articles.

Dans ces travaux, nous avons privilégié l'analyse histologique de l'os bien évidemment, et de certains organes que nous avons estimés importants du fait de leur impact sur le métabolisme de l'os.

Chapitre I : Effet de l'extrait aqueux du mil à chandelle versus alendronate sur les mandibules et les glandes salivaires de rats soumis au régime cafétéria associé à des corticostéroïdes

Article 1:

Effect of pearl millet extract versus alendronate on mandibles and salivary glands of rats subjected to cafeteria diet associated with corticosteroids.

Ali KADDAFI 1,2*, Bouchra MEDDAH2, Omar ELBLIDI1, Zakia RAIS3, Omar CHOKAIRI1, Yahia CHERRAH2, Malika BARKIYOU1

1 Laboratory of histology, embryology and cytogenetics, Faculty of Medicine and Pharmacy Mohammed V University Rabat, Morocco.

2 Laboratory of pharmacology and toxicology, Faculty of medicine and pharmacy, Mohammed V University Rabat, Morocco

3 Department of chemistry, Laboratory of physico-chemical and catalytic materials, Faculty of sciences Dhar El Mehrez, Sidi Mohamed Ben Abdellah University, Fez, Morocco

Résumé :

Effet de l'extrait aqueux du mil à chandelle versus alendronate sur les mandibules et les glandes salivaires de rats soumis au régime cafétéria associé à des corticostéroïdes

Beaucoup d'études ont démontré que les glucocorticoïdes et le régime cafétéria (CD) sont parmi les facteurs de risque impliqués dans l'ostéopénie. Le but de cette étude est d'évaluer l'effet de l'extrait aqueux de *Pennisetum glaucum* L (AEPG) par rapport à un bisphosphonate, l'Alendronate (ALN) sur la composition biochimique et histologique des mandibules et des glandes salivaires parotides des rats alimentés par un régime de type cafétéria associé à la méthylprednisolone (MPS) par administration intrapéritonéale (ip). Trente-six femelles de six semaines ont été divisées en six groupes: groupe témoin; Groupe CD, groupe CD-MPS [CD, MPS (9 mg.kg⁻¹ de poids corporel (bw) ip)]; groupe CD-AEPG [CD, (250 mg.kg⁻¹ pc par os (po)], CD -MPS-AEPG group [CD, MPS (9 mg.kg⁻¹b.w (ip)), AEPG (250 mg.kg⁻¹, bw po)]; groupe CD-MPS-ALN [CD, MPS (9 mg .kg⁻¹b.w., Ip), ALN (2 mg.kg⁻¹ bw, po)]. Ces produits ont été administrés pendant 5 jours / semaine. Après une période de traitement de 6 semaines, les rates ont été pesées. Les glandes salivaires et les maxillaires ont été isolés et nettoyés de tous les tissus mous et pesés. Les mandibules ont été analysées pour la composition biochimique. Des examens histologiques ont été réalisés pour les mandibules et les glandes salivaires. Les mandibules ont fait l'objet d'un examen au microscope électronique à balayage. Dans notre étude, nous avons démontré que le traitement AEPG obtient une meilleure amélioration que l'ALN concernant la teneur en calcium des mandibules. Nous avons noté également une augmentation de la teneur en manganèse. Il est remarquable que l'os trabéculaire apparaisse intact pour les groupes traités avec AEPG par rapport aux autres groupes, sauf le groupe ALN où nous avons noté une amélioration réelle mais inférieure à celle du Groupe AEPG. Ces résultats suggèrent que l'AEPG pourrait être utilisé pour prévenir la fragilité osseuse et accélérer la formation des os chez les rats soumis à un régime cafétéria associé à la méthylprednisolone.

Mots-clés: mil à chandelle, mandibule, méthylprednisolone, régime cafétéria, alendronate, rat



Effect of pearl millet extract versus alendronate on mandibles and salivary glands of rats subjected to cafeteria diet associated with corticosteroids

Ali KADDAFI^{1,2*}, Bouchra MEDDAH², Omar ELBLIDI¹, Zakia RAIS³, Omar CHOKAIRI¹, Yahia CHERRAH², Malika BARKIYOU¹

¹ Laboratory of histology, embryology and cytogenetics, Faculty of Medicine and Pharmacy Mohammed V University Rabat, Morocco.

² Laboratory of pharmacology and toxicology, Faculty of medicine and pharmacy, Mohammed V University Rabat, Morocco

³ Department of chemistry, Laboratory of physico-chemical and catalytic materials, Faculty of sciences Dhar El Mehrez, Sidi Mohamed Ben Abdellah University, Fez, Morocco

Received 05 Apr 2015, Revised 16 Feb 2016, Accepted 28 Feb 2016

*Corresponding author. E-mail: ka.ali20@yahoo.fr

Abstract

Many studies suggested that glucocorticoids and cafeteria diet (CD) are among the risk factors involved in osteopenia. The aim of this study is to evaluate the effect of aqueous extract of *Pennisetum glaucum* (AEPG) compared to a bisphosphonate, the Alendronate (ALN) on biochemical composition and histological of mandibles and parotid salivary glands of rats fed cafeteria diet associated with methylprednisolone (MPS) intraperitoneal (ip) administration. Thirty six 6week-old-females were divided into six groups: control group; CD group, CD-MPS group [CD, MPS (9 mg.kg⁻¹ of body weight (b.w.) ip); CD-AEPG group [CD, (250 mg.kg⁻¹ b.w per os (po)), CD-MPS-AEPG group [CD, MPS (9 mg.kg⁻¹b.w (ip)), AEPG (250 mg.kg⁻¹, b.w. po)]; CD-MPS-ALN group [CD, MPS (9 mg.kg⁻¹b.w., ip), ALN (2 mg.kg⁻¹ b.w., po)]. These products were administered for 5 days/week. After 6-weeks treatment period of the study, rats were weighted. Mandibles and maxillary salivary glands (MSG) were isolated and cleaned of all soft tissue and weighted. The mandibles were analyzed for biochemical composition, histology and ultrastructure. The salivary glands were just analyzed by histological technics. In our study, we demonstrated that AEPG treatment obtains better amelioration than ALN without significant decrease calcium content. We noted also an increase of manganese content. Remarkably, trabecular bone appeared intact for groups treated with AEPG compared to the others groups, except the group of ALN where we noted real amelioration but less than AEPG group. These findings suggest that the AEPG could be used to prevent bone diseases and accelerate bone formation in rats feeding cafeteria diet associated with methylprednisolone.

Keywords: Pearl millet, mandible, methylprednisolone, cafeteria diet, alendronate, rat.

1. Introduction

Bone growth in adolescent is a crucial period. However, long-term glucocorticoid treatment increases the risk of several serious diseases, such as osteoporosis, bone fragility and fractures events [1], and knows to alter oral homeostasis [2]. Osteoporosis is a public health problem principally involving postmenopausal women and older people. Corticosteroids interfere with the coupling of resorption and deposition cycle in normal bone, which results in reduced bone formation and increased bone resorption [3]. Many disorders are linked to a high fat diet. Fat and calorie-dense foods and sedentary life styles provoke long-term imbalances between energy uptake and expenditure. Numerous studies indicate that increase high fat diet may be directly responsible of both increase marrow adipogenesis and decrease osteoblast differentiation [4, 5].

Bisphosphonates (BPs) are widely used in the treatment of osteonecrosis [6], and osteoporosis therapy [7]. They are strong antiresorptive drugs. Bisphosphonates suppress bone resorption by abolishing mature osteoclasts and hindering osteoclast formation from precursors [8]. It is known that these drugs can be used at lower dose and defined period to provide valuable protection concerning the physiology bone or alveolar bone alteration [9].

Pearl millet (*Pennisetum glaucum*) belongs to the family of *poaceae*. In Africa and Asia countries, pearl millet is cultivated as edible seeds. This plant has several types of medicinal values as antidiabetic [10]. Its dried seeds were widely used as a folk medicine in Morocco to improve traumatic pains and bone' fractures, but they were not evaluated scientifically.

The aim of this study was to evaluate the effect of aqueous extract of *Pennisetum glaucum* on biochemical composition and histological of mandibles and maxillary salivary glands (MSG) of rats fed a cafeteria diet associated with methylprednisolone intraperitoneal administration.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Six week-old-female Wistar rats (50 to 60 g) were used for these experiments respecting all the Rabat Medical Pharmacy School IRB. They were housed three per plastic cages (42 × 26 × 18 cm) in a room at 25°C controlled temperature, 50% relative humidity and in 12 h light/ 12 dark cycles. All animals were provided with filtered tap water and standard diet ad libitum and allowed to acclimate for one week. All procedures performed throughout the experiment conformed to the guidelines of Council instructions about the protection of living animal used in scientific investigations.

2.2. Sample preparation plant

Whole grains of pearl millet (*Pennisetum glaucum* L.) were obtained from Rabat herbalist (Morocco). The grains identified by the botanic department of the National Scientific Institute, were dried at room temperature and grounded to obtain a fine powder using an electric blender. For the aqueous extract of *Pennisetum glaucum* (Aepg), 1 kg of fine powder was mixed with distilled water (3 volumes) in a glass jar and left for 2 days at room temperature in an orbital digital agitator (Rotatest 560VIT. 15-300 T/MIN). The solvent was filtered through Whatman pleated filter paper number 3. The filtrate was concentrated under reduced pressure using a rotary vacuum evaporator [13] and stored at + 4°C.

2.3. Experimental protocol

The rats of this experimentation were randomly divided into six groups (n=6) for 36 days. The experiments were conducted between 10h00 and 12h00, and various products were tested as follows: control group; CD group; CD-MPS group [CD, MPS (9 mg.kg⁻¹ of body weight (b.w.) intraperitoneally (ip)]; CD-AEPG group [CD, (250 mg.kg⁻¹ b.w per os (po)]; CD-MPS-AEPG group [CD, MPS (9 mg.kg⁻¹ b.w (ip)), AEPG (250 mg.kg⁻¹, b.w po)]; CD-MPS-ALN group [CD, MPS (9 mg.kg⁻¹ b.w. (ip)), ALN (2 mg.kg⁻¹ b.w. po)]. MPS, AEPG and ALN were administered for 5 days/week. At the end of the 6-wk treatments period of the study, rats were weighed, then anesthetized with overdose of diethyl ether. After sacrifice, all mandibles and maxillary salivary glands (MSG) were isolated and cleaned of all soft tissue. The MSG and mandible were immediately weighted by electronic balance (Redwag, PS 110/C/1) to determine weight. The mandible length and width were measured with vernier caliper (Eclipse, Farnell) (figure 1). The samples were fixed in 10% neutral buffered formalin for 24 hours. The left mandibles were used for histological evaluation. The right mandibles were used for scanning electron microscopy and mineral composition by inductively coupled plasma emission atomic spectrometry (ICP-AES).

2.4. Cafeteria diets

The cafeteria diet (CAF) adopted, providing modified versions of Harris high fat cafeteria diet [11]. It consisted of 3 variants: (i) condensed milk + bread + peanuts + pellet chow (4:1:4:1), (ii) chocolate + biscuits + dried

coconut + pellet chow (3:2:4:1), and (iii) cheese + boiled potatoes + beef tallow + pellet chow (4:2:4:1). The different variants were presented on alternate days throughout the treatment period [12].

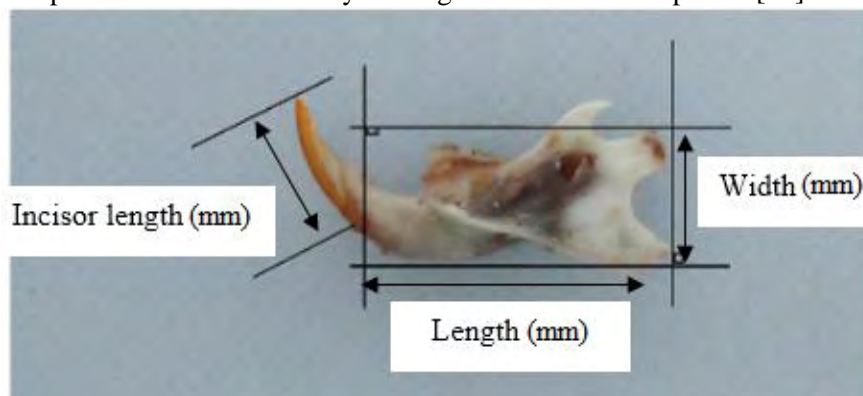


Figure1. Macroscopic measurement of mandibles of rats

2.5. Mineral analysis of bone

The right mandible was chosen for mineral composition analysis. The mandible was weighted to determine the wet weight (WW), dried to eliminate water and weighted to determine the percentage of water content (% water composition = $[(WW-DW)/WW] \times 100$). Mandible was placed in a 70°C incubator (Schutzart DIN 40050 IP-20, Germany) for 48 hours. After recording the dry weights, the mandible was digested by placing them in solution of 5 mL concentrated nitric acid (HNO₃), 3 mL 70% perchloric acid (HClO₄) and 2 mL 35% hydrogen peroxide and microwaving at 180 PSI and 180°C. Mineral concentrations were measured by inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy (ICP-AES, Jobin Yvon Ultima2) [14].

2.6. Histological evaluation

Histological evaluation was performed using a magnifying glass. After fixation, the left mandibles were decalcified in 5% nitric acid for 27 days. All the samples were dehydrated by graded series of alcohols (Schlauer, Scharlab S.L, Spain) from 50-100%. The specimens were cleared and impregnate in Toluene (Prolabo, Analor Norma pur, VWR International SAS, French). Following dehydration, the mandible and salivary glands were embedded in paraffin and 5 µm thick slices were taken from the length, and the stained with Hematoxylin-eosin and Manson's Trichrom [15]. The slides were observed by light microscope (Leica Microsystems DM2500, Germany).

2.7. Scanning electronic microscopy

Bone structure was evaluated by scanning electronic microscopy (SEM). After fixation, undercalcified bone samples were dehydrated through a graded series (70%, 90%, 95%, 100%) of alcohol [16], then evaluated in environment SEM operating (Philips XL Series, Fei Quanta 200) at 30 kV.

2.8. Statistical analysis

Data was presented as the mean ± standard error mean (SEM) for six groups (n = 6). Multiple comparisons were analyzed between groups using one way analysis of variance and Bonferroni's post-hoc test. Significance was established at $p < 0.05$ comparing all treatment groups to control. Data analyses were performed using Graph Pad Prism, version 6.

3. Results and discussion

The aim of our study is to demonstrate that the AEPG has a very important role in preventing the consequent bone abnormality of methylprednisolone administration in rats previously feeding the cafeteria diet. In addition, we compared the results with the action of alendronate which is a bisphosphonate whose action is known and documented concerning its role in the prevention and treatment of osteoporosis.

We considered the following parameters:

3.1. Macroscopical parameters

Figure 1 shows the methodology used to measure the macroscopic parameters of mandible. At the beginning of the study, the body weight shows no significant difference in all groups, as shown in figure 2. So, the CD and MPS effects on body weight revealed no significant difference in the first five weeks. As shown in figure 2A, body weight gain was significantly increased in CD and CD-AEPG groups compared to the control group ($p < 0.001$, $p < 0.01$ respectively) after week 6.

MSG weight no significantly increased in both CD and CD-AEPG groups compared to the other groups (figure 2). Thus, combination of MPS and ALN showed insignificantly reductions in the weight of MSG compared to the control group. Mandible weight shows no significant difference in all animal's groups. As shown in Table 1, CD or the combination of AEPG and CD for 6-week shows no significantly increase of the length and width jaw growth. The water content mandible was no significantly decreased in MPS treatment. We noted that the incisor length was no significantly increased in the MPS-AEPG or MPS-ALN groups.

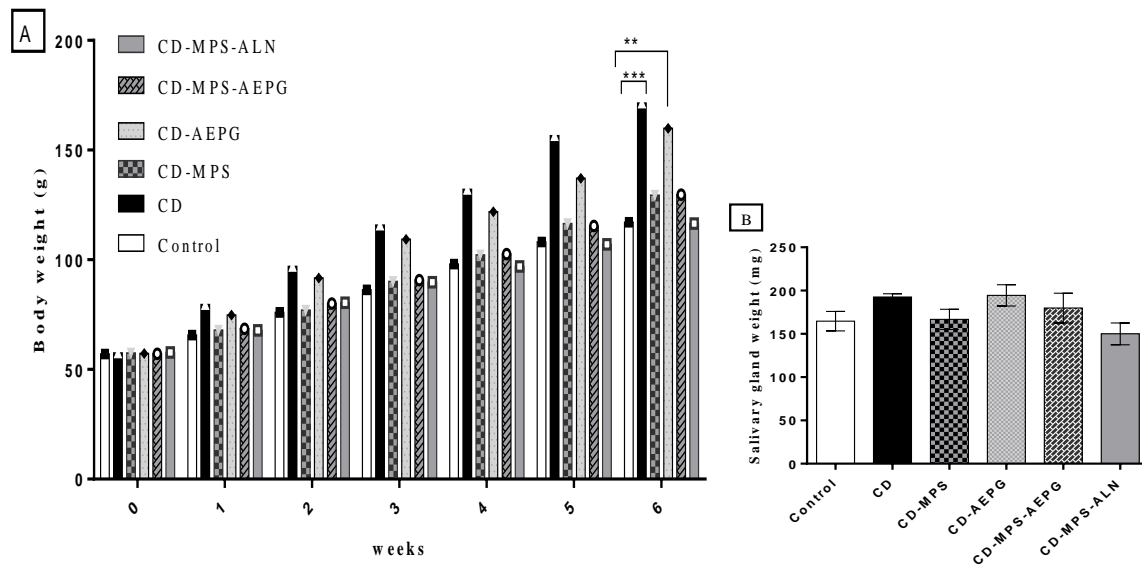


Figure 2. (A) Changes in body weight during the treatment period; (B) body of parotid salivary gland. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, compared with control group.

The relationship between glucocorticoid and osteoporosis was demonstrated by several authors. In the present study, we have showed that MPS intraperitoneally administration reduced body weight in rats, but no significantly. Similar studies have demonstrated a negative association between glucocorticoid and body weight or growth [17]. The mandible weight was decreased in ALN group compared to the control group, but no significantly. Some studies reported this result [18]. According to other study, dexamethasone administration induced significant loss of body weight in rat [19]. Our results showed that six weeks treatment of MPS decreased no statistically significant weight of maxillary salivary glands. Our findings revealed that MPS had no significantly difference on either mandible length or width of rat. The knowledge about glucocorticoid effect on mandible was demonstrated [17].

When adjusted for ALN, the weight, length and width of mandible were decreased compared to MPS groups, but we observed no significant differences between the groups. This difference can be explained that ALN plays an important role in the jaw osteonecrosis if used for long time. It's admitted that bisphosphonate effect is associated with the development of osteonecrosis in the jaws of rodents after tooth extraction [18, 20, 21]. Generally, we don't find significant changes concerning the rat body mass, mandible and MSG weight, as well as the length and width of mandible.

Table 1. Descriptive macroscopical parameters of mandibles of rats

Groupes	Jaw weight (mg)	Jaw length (mm)	Jaw width (mm)	Incisor length (mm)	Water content jaw (%)
Control	275.800±15.560	20.670±0.210	9.500±0.316	9,333±0.166	0,373±0.012
CD	297.500±11.870	21.250±0.250	10.000±0.000	9.500±0.182	0,385±0.011
CD-MPS	258.500±10.720	20.670±0.333	9.750 ±0.250	8.833±0.307	0,353±0.010
CD-AEPG	270.000±12.040	21.000±0.447	9.917±0.153	9.330±0.477	0,361±0.006
CD-MPS-AEPG	269.800±9.116	20.920±0.327	9.830±0.210	10.000±0.258	0,410±0.022
CD-MPS-ALN	250.000±9.903	20.500±0.408	9.660±0.166	10.000±0.223	0,409±0.018

Data are expressed as mean ± SEM. Control group, CD: cafeteria diet, CD-MPS: cafeteria diet + methylprednisolone, CD-AEPG: cafeteria + *Pennisetum glaucum*, CD-MPS-AEPG: cafeteria diet + methylprednisolone + *Pennisetum glaucum*, CD-MPS-ALN: cafeteria diet + methylprednisolone + alendronate.

3.2. Mineral analysis

Mandible mineral content is reported in table 2. No difference in the concentration of calcium, magnesium and iron content were seen between control group and experimental groups. The AEPG administration shows no significantly decrease calcium and manganese content than the others groups.

As shown in **table 2**, we revealed that zinc content of CD-MPS-AEPG group was significantly increased ($p < 0.05$) compared to the CD-MPS group. This result showed that MPS diminished mineral content of mandible. Both of the AEPG and ALN treatment were significantly attenuated MPN effect of manganese content ($p < 0.01$, $p < 0.01$ respectively). Our results showed that CD has significant increased manganese content in mandible than in the control group, but no significant increased calcium, phosphorus and iron content compared to the control group respectively. Similar findings for bone mineral content were reported that high fat diet may have long-term consequences for skeletal health and skeletal pathologies such as osteopenia [22]. In our case, we have seen an increase of manganese for groups treated by AEPG and ALN significantly.

Table 2. Analysis mineral concentration of right mandible in rats measured by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry.

Parameters	Control	CD	CD-MPS	CD-AEPG	CD-MPS-AEPG	CD-MPS-ALN
Ca (%)	23.920±2.064	25.77±2.443	26.48±0.441	22.820±2.383	26.470±0.967	26.670±0.703
Mg (%)	0.481±0.038	0.479±0.028	0.476±0.006	0.416±0.043	0.441±0.016	0.447±0.011
P (%)	12.180±1.145	18.16±2.644	15.700±3.30	14.240±2.517	19.640±0.612 ^a	19.720±0.427 ^a
Fe (%)	0.023±0.002	0.043±0.012	0.036±0.005	0.033±0.003	0.038±0.004	0.038±0.005
Zn (%)	0.055±0.006	0.060±0.007	0.036±0.002	0.043±0.002	0.043±0.001 ^c	0.048±0.000
Mn (≤mg/L)	2.630±0.221	4.453±0.227 ^a	4.007±0.053 ^a	3.682±0.138	4.300±0.065 ^{ad}	4.313±0.109 ^a

Data are expressed as mean ± SEM. Control group, CD: cafeteria diet, CD-MPS: cafeteria diet + methylprednisolone, CD-AEPG: cafeteria + *Pennisetum glaucum*, CD-MPS-AEPG: cafeteria diet + methylprednisolone + *Pennisetum glaucum*, CD-MPS-ALN: cafeteria diet + methylprednisolone + alendronate. Ca: calcium; Mg: magnesium; Fe: iron P: phosphorus; Zn: zinc; Mn: manganese

^a $p < 0.05$ vs control group, ^b $p < 0.05$ vs CD group, ^c $p < 0.05$ vs CD-MPS group, ^d $p < 0.05$ vs CD-AEPG group, ^e $p < 0.05$ vs CD-MPS-AEPG group.

^a $p < 0.05$, ^a $p < 0.05$ vs CD-MPS-AEPG, CD-MPS-ALN (P) respectively. ^c $p < 0.05$ vs CD-MPS (Zn).

^a $p < 0.001$, ^a $p < 0.05$, ^{ap} $p < 0.01$, ^a $p < 0.01$ vs CD, CD-MPS, CD-MPS-AEPG, CD-MPS-ALN (Mn) respectively, ^d $p < 0.05$ vs CD-MPS-AEPG (Mn).

Our investigations showed that MPS treatment was significantly decreased phosphorus and zinc content compared to be combination treatment groups. Many studies have confirmed that glucocorticoid administration induced bone loss [23]. We indicate that CD did not affect magnesium content. It was demonstrated that GCs directly and indirectly influence bone mineralization at multiple levels [24]. In this study, we revealed that combination treatment of CD and AEPG don't bring real effect for calcium, magnesium, iron and phosphorus content compared to the control group.

3.3. Histologic evaluation

Histological analysis of maxillary salivary glands was presented in figure 3. The group receiving CD showed higher fat vacuole than those in the corresponding control group. The combination of CD and MPS increased the expression of fat vacuole and decreased acinar cell volume in comparison to alendronate and AEPG treatment groups, where we see real decrease of fat vacuoles. Our data showed that administration of MPS caused a decrease in the masses of maxillary salivary glands. It is noted that MPS showed the reductions of the acinar cells volume. Combination CD treatment with AEPG marked higher amelioration, which decreased fat vacuole in the acinar cells. ALN treatment was revealed some cellular alteration as striated duct. It is known that that bisphosphonates induce alterations and disturb functional salivary glands [25]. Furthermore, circumferences of acinar cells were normal and regular in the experimental groups (CD-AEPG, CD-MPS-AEPG respectively). In the two groups where we used AEPG, we noted better amelioration than alendronate.

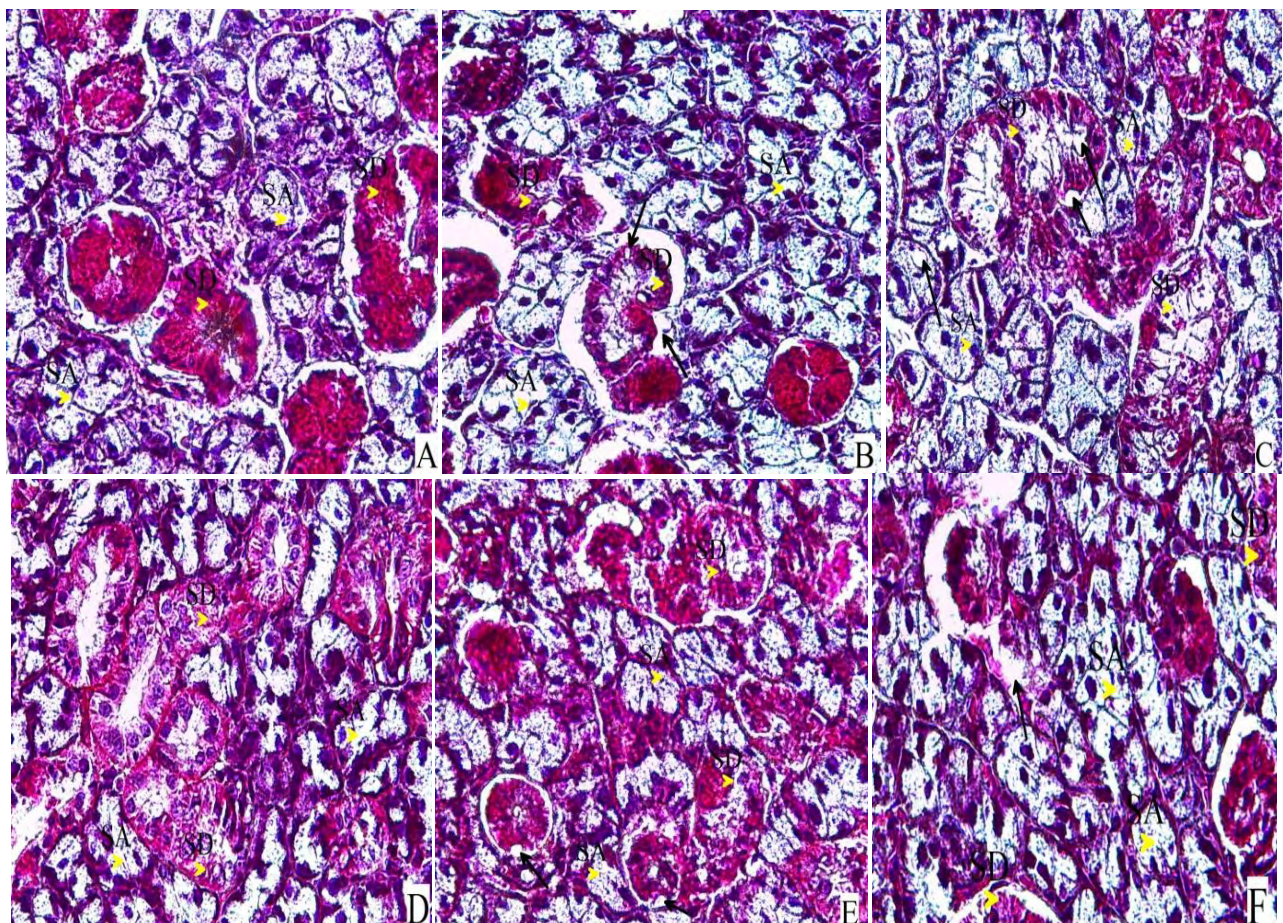


Figure 3. Masson's trichrom staining (200× magnification) of maxillary salivary gland: (A): control group; (B): CD group; (C): CD-MPS group; (D): CD-AEPG group; (E): CD-MPS-AEPG group; (F): CD-MPS-ALN group. SA, serous alveolus; SD, striated duct. Black arrows denote the fat vacuole.

In this investigation, our research focalized on trabecular bone of mandible. HE staining showed the bone quality. In both CD and MPS groups, bone size was decreased.

Hematoxylin-eosin stains (200×, magnification) examination shows regular trabecular bone in control group. In the present study, we evaluated antiosteoporosis activity of AEPG against MPS. We noted higher trabecular bone separation and loss of jagged trabecular in CD and CD-MPS groups. Combination treatment of CD-AEPG or CD-MPS-AEPG showed an increase of the trabecular size with intact structure. Several studies showed that glucocorticoid therapy decreases bone formation rate, decreased wall thickness of trabeculae and in situ death of portions of bone as causal factor for the bone pathology and structure alteration [23, 24]. Bone marrow was moderately reduced in CD group and replaced by fat vacuole. Our data showed many irregularly osteocytes and osteoid cells, which osteocytes lacunae was observed in MPS group compared to the control group. Combination treatment of alendronate and MPS increased trabecular bone, but higher degree of irregular structural was noted with increased osteocytes cells.

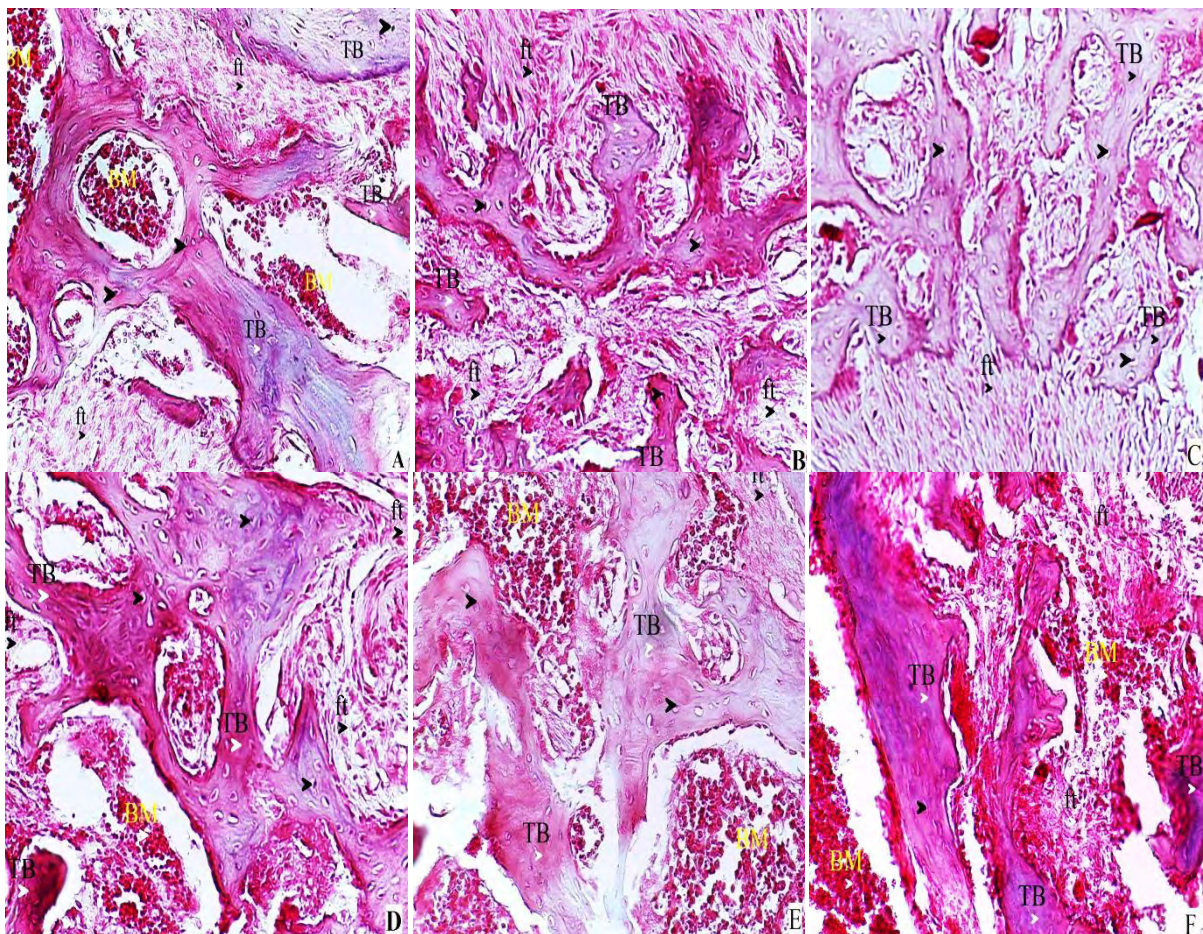


Figure 4. Hematoxylin and eosin staining (200× magnification) of mandibular bone: (A) control group; (B): CD group; (C): CD-MPS group; (D): CD-AEPG group; (E): CD-MPS-ASP group; (F): CD-MPS-ALN group. BM: bone marrow; ft: fibrous tissues; fv: fat vacuole; TB: trabecular bone.

Analysis of the sections of the left mandible of control group revealed normal trabecular bone structure and bone marrow in inter-trabecular spaces (figure 4). We also noted that the animals from CD and CD-MPS groups showed a decrease trabecular size of mandible. In the CD and CD-MPS groups, the numerous fat vacuoles observed were elevated in bone marrow.

Masson's Trichrom reveals some parameters as fibrous tissue. It shows highly specialized cells, mineralized and unmineralized connective tissue matrix, and spaces that include the bone marrow cavity, vascular canals, canaliculi, and lacunae. Osteocytes have emerged as key regulators of skeletal and mineral homeostasis. Thus, the number of these cells could be influenced by the presence of osteoporosis and osteopenia [26]. Besides the

density of fibrous tissue, we have revealed the abundant content of fibrous in both AEPG-treated animals compared to control group (figure 5). However, in the CD-MPS group, the few new bone and fibrous tissue were reduced and arranged dispersedly. The treatment of osteoporosis provides not only usage of antiresorptive drugs such as bisphosphonates but also drugs characterized by a stimulating action on osteoblastic component and therefore on neoplasm, like teriparatide [27]. MPS reduced fibrous tissue that is replaced by necrotic bone. The action mechanism of AEPG is still unknown, but it seems to mitigate osteoclasts cells. Several studies have reported that BPs could be impairing molecular signaling not only of osteoblasts and osteoclasts [28], but also of fibroblasts and keratinocytes [29].

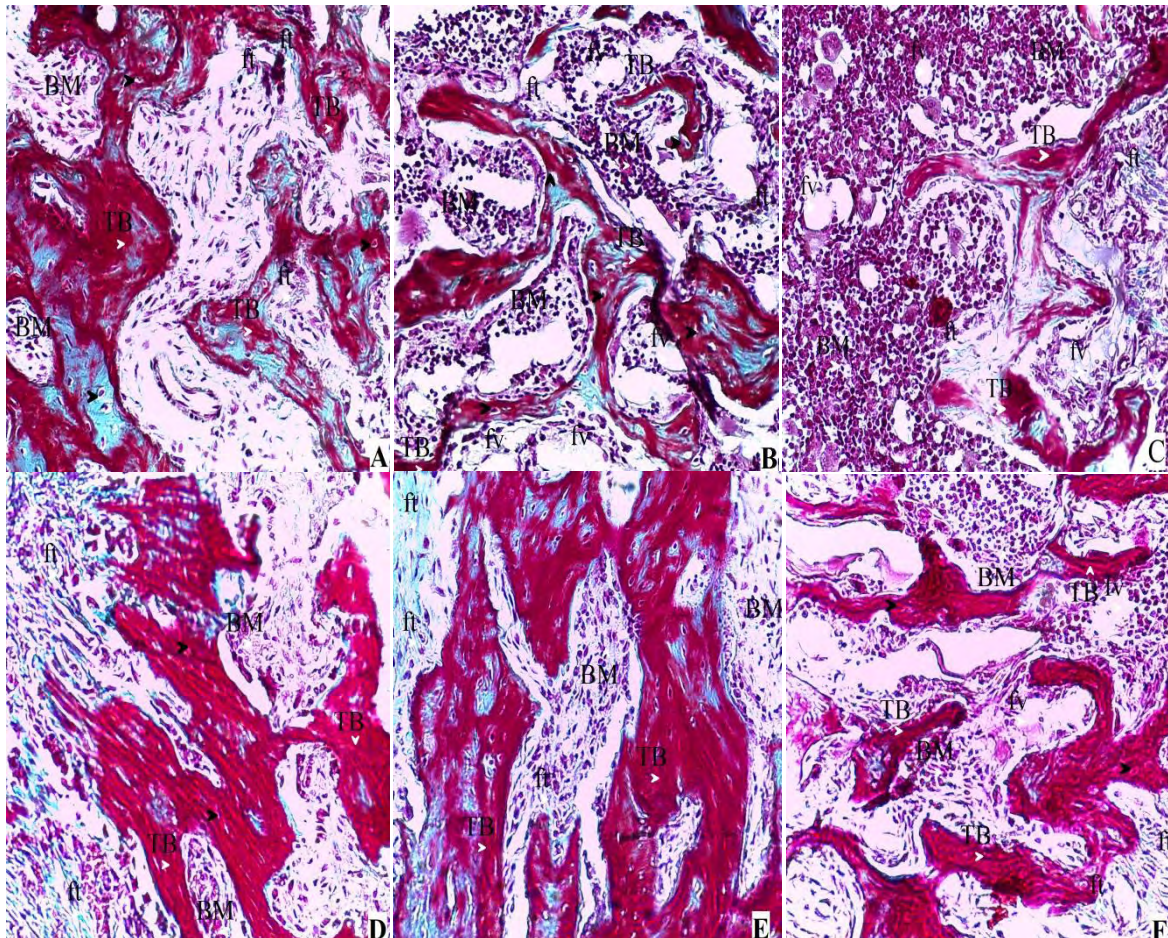


Figure 5. Effect of AEPG on mandible histological examination. Masson's trichrom staining (200× magnification) of submandibular gland: (A) control group; (B) CD group; (C) CD-MPS group; (D) CD-AEPG group; (E) CD-MPS-AEPG group; CD-MPS-ALN group. BM: bone marrow; ft: fibrous tissues; fv: fat vacuole; TB: trabecular bone.

3.4. Scanning electronic microscopy

On SEM images obtained from mandible revealed the severe bone destruction in CD and MPS groups (Figure 6). Our observations demonstrated that CD or CD-MPS provoked a remarkable resorption areas and a decrease in the thickness of the trabecular bone of the mandible. Our data indicate that methylprednisolone aggravates alter and loss bone in the cancellous bone in CD group. MPS administration revealed important bone destruction in CD-MPS group. It known that glucocorticoid decreases the bone production and increases the bone destruction [30]. Remarkably, trabecular bone appeared intact for groups treated with AEPG compared to the others groups, except the ALN group where we noted real amelioration but less than AEPG group.

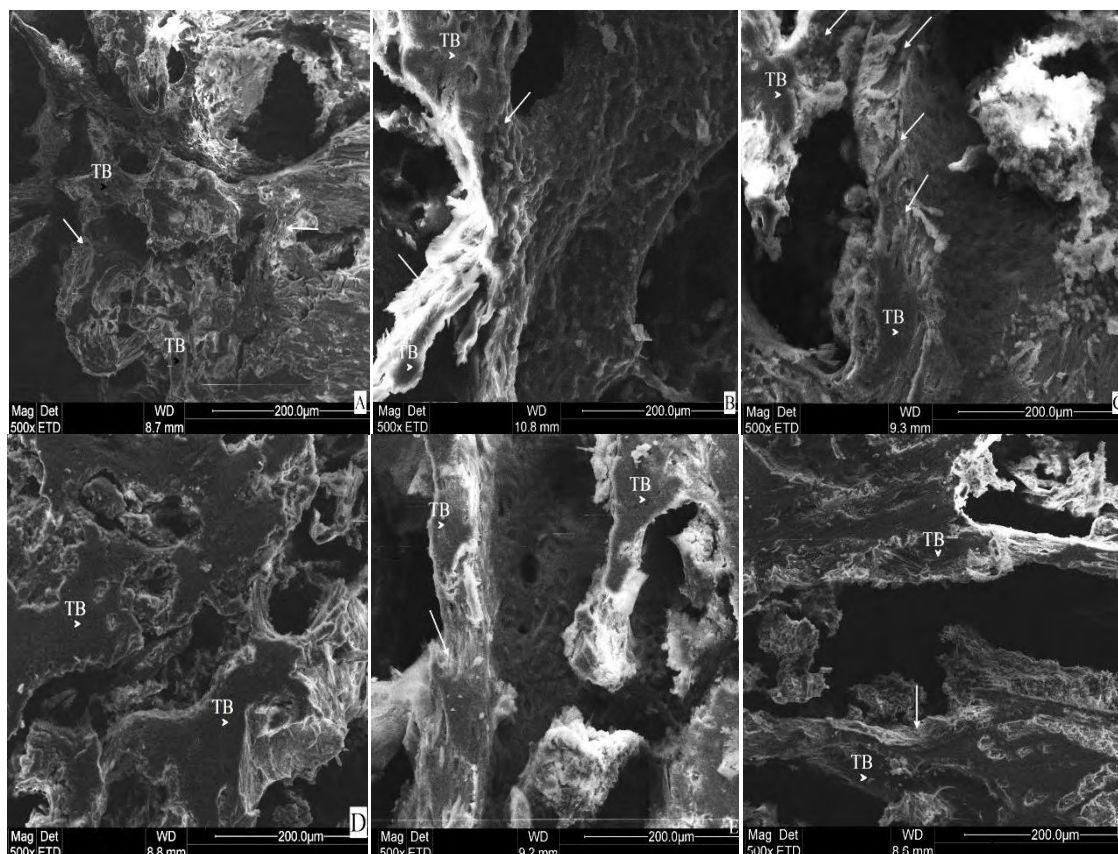


Figure 6. Scanning electronic microscopy images (500× magnifications) revealed mandibular bone defect: (A) control group; (B) CD group; (C) CD-MPS group; (D) CD-AEPG group; (E) CD-MPS-AEPG group and CD-MPS-ALN group. White arrows denote the remodeling areas defect.

Conclusion

1. The administration combined of corticoid and high-fat diet in rat altered mineral composition, salivary gland structure and trabecular bone
2. In our study, we demonstrated that AEPG treatment obtains better amelioration than ALN without significant decrease calcium content. We noted also an increase of manganese content.
3. Remarkably, trabecular bone appeared intact for groups treated with AEPG compared to the others groups, except the group of ALN where we noted real amelioration but less than AEPG group.
4. The action mechanism of AEPG is still unknown, but it seems to mitigate osteoclasts cells.
5. It seems that AEPG has real advantage effect, so it can be used in the prevention of osteopenia induced by methylprednisolone treatment in rats.

Acknowledgements

The authors acknowledge ongoing research support and financier by grants from President of Mohammed V University in Rabat, and Doyen of School medicine and pharmacy, Rabat, Morocco.

References

1. Kanis J. A., Johansson H., Oden A., Johnell O., de Laet C., Melton III L. J., Tenenhouse A., Reeve J., Silman A. J., Pols H. A., Eisman J. A., McCloskey E. V., Mellstrom D., *J. Bone. Miner. Res.* 19 (2004) 893.
2. Bighetti B. B., d Assis G. F., Vieira D. C., Violato N. M., Cestari T. M., Taga R., Bosqueiro J. R., Rafacho A., *Int. J. Exp. Pathol.* 95 (2014) 351.
3. Ong C. K., Walsh L. J., Harbrow D., Taverne A. A., Symons A.L., *Angle. Orthod.* 70 (2000) 118.

4. Chen J. R., Lazarenko O. P., Wu X., Tong Y., Blackburn M. L., Shankar K., Badger T. M., Ronis M. J., *PLoS. One.* 5 (2010) 13704.
5. Halade G. V., Rahman M. M., Williams P. J., Fernandes G., *J. Nutr. Biochem.* 21 (2010) 1162.
6. Polymenidi I., Trombetti A., Carballo S., *Rev. Med. Suisse.* 10 (2014) 1930.
7. Oliveira T. C., Bradaschia-Correa V., Castro J. R., Simões A., Arana-Chavez V. E., *Arch. Oral. Biol.* 59 (2014) 1307
8. Yamashita J., McCauley L. K., *J. Evid. Base. Dent. Pract.* 12 (2012) 233.
9. Ramalho-Ferreira G., Faverani L., Grossi-Oliveira G.A., Okamoto T., Okamoto R., *J. Biomed. Opt.* 20 (2015) 3.
10. Venkata P. S., Rajesh N., Swapna S., Chippada A. R., *J. Pharm. Chem.* 2012; 6 (2012) 36.
11. Harris R., *Int. J. Obes.* 17 (1993) 307.
12. Kamalakkannan S., Rajendran R., Venkatesh R.V., Clayton P., Akbarsha M.A., *J. Nutr. Metab.* 2010 (2010) 1.
13. Hakki S. S., Dundar N., Kayis S. A., Hakki E. E., Hamurcu M., Kerimoglu U., Baspinar N., Basoglu A., Nielsen F. H., *J. Trace. Elem. Med. Biol.* 27 (2013) 148.
14. Hafezi M., Talebi A. R., Miresmaeili S. M., Sadeghian F., Fesahat F., *Ceram. Int.* 39 (2013) 4575.
15. Jimenez-Palomar I., Shipov A., Shahar R., Barber A. H., *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 5 (2012) 149
16. Fujita Y., Konoo T., Maki K., *Orthod. Craniofac. Res.* 11 (2008) 187.
17. Conte N. N., Spolidorio L. C., Andrade C. R., Bastos A. S., Guimarães M., Marcantonio E. J., *Int. J. Exp. Pathol.* 94 (2013) 65.
18. Fappi A., Godoy T. S., Maximino J. R., Rizzato V. R., Neves J. C., Chadi G., Zanoteli E., *Biomed. Res. Int.* 2014 (2014) 13.
19. Bi Y., Gao Y., Ehriochou D., Cao C., Kikuri T., Le A., Shi S., Zhang L., *Am. J. Pathol.* 177 (2010) 280.
20. Ersan N., van Ruijven L. J., Bronckers A. L., Olgac V., Ilgüy D., Everts V., *Dentomaxillofac. Radiol.* 43 (2014) 20130144.
21. Woo D. G., Lee B. Y., Lim D., Kim H. S., *J. Biomech.* 42 (2009) 1102.
22. Mazziotti G., Angeli A., Bilezikian J. P., Canalis E., Giustina A., *Trends. Endocrinol. Metab.* 17 (2006) 144.
23. Govindarajan P., Khassawna T., Kampschulte M., Böcker W., Huerter B., Dürselen L., Faulenbach M., Heiss C., *Int. J. Exp. Pathol.* 94 (2013) 387.
24. Carpinteri R., Porcelli T., Mejia C., Patelli I., Bilezikian J. P., Canalis E., Angeli A., Giustina A., Mazziotti G., *J Endocrinol. Invest.* 33 (2010) 16.
25. Oliveira P. S., Rodrigues J., Shibli J.A., Piattelli A., Iezzi G., Perrotti V., *Clin. Oral. Implants. Res.* (2014) 1.
26. Nuti R., *Clin. Cases. Miner. Bone. Metab.* 11 (2014) 208.
27. Idris A. I., Rojas J., Greig I. R., Van't Hof R. J., Ralston S. H., *Calcif. Tissue. Int.* 82 (2008) 191.
28. Kyrgidis A., Triaridis S., Antoniadis K., *Biosci. hypotheses.* 2 (2009) 153.
29. Reid D., *Br. J. Rheumatol.* 36 (1997) 1035.

(2016) ; <http://www.jmaterenvironsci.com>

Chapitre II: Comparaison sur les plans biochimique et histologique de l'effet de « *Pennisetum glaucum L.* » et de l'alendronate sur les vertèbres lombaires et le foie de rats alimentés par un régime cafétéria associé à un traitement glucocorticoïde

Article 2:

Comparative effect of “*Pennisetum glaucum L.*” and alendronate on biochemical and histological analyses of lumbar vertebrae and liver for rats fed cafeteria diet associated with glucocorticoid therapy

Kaddafi ALI ^{1,2*}, Bouchra MEDDAH², Riadh BADRAOUI³, Omar ELBLIDI¹,
Yahia CHERRAH², Omar CHOKAIRI¹, Malika BARKIYOU¹

1. Laboratory of histology, embryology and cytogenetics, Faculty of medicine and pharmacy, Mohammed V University – Rabat, Morocco, Av. Mohammed BelarabiElalaoui, BP: 6203 Rabat-Instituts, Rabat, Morocco

2. Laboratory of pharmacology and toxicology, pharmacokinetic Research Team, Faculty of medicine and pharmacy, University of Mohammed V – Rabat. Av. Mohammed BelarabiElalaoui, BP: 6203 Rabat-Instituts, Morocco

3. Laboratory of histology, embryology, Faculty of medicine, Sfax University, Av Majida Boulila , Sfax 3029, Tunisia

Résumé :

Comparaison sur les plans biochimique et histologique de l'effet de « *Pennisetum glaucum L* ».et de l'alendronate sur les vertèbres lombaires et le foie de rats alimentés par un régime cafétéria associé à un traitement glucocorticoïde

La thérapie par les glucocorticoïdes provoque des effets secondaires graves, parmi lesquels l'ostéoporose, le retard de croissance, la fragilité osseuse et l'augmentation des fractures osseuses. L'objectif de cette étude est d'évaluer l'effet de l'extrait aqueux de *Pennisetum glaucum* (AEPG) et l'alendronate (ALN) sur les vertèbres lombaires chez des rats nourris par le régime cafétéria (CAF) associée à la méthylprednisolone (MPN), un glucocorticoïde largement utilisé en thérapie. Trente-six rats Wistar ont été randomisés dans six groupes de six animaux chacun: le groupe témoin a reçu un régime standard pour les rats; Le groupe CAF a reçu un régime cafétéria; le groupe CAF + MPN a reçu CAF + MPN (9 mg / kg de poids corporel par voie intrapéritonéale); le groupe CAF + AEPG a reçu CAF + AEPG (250 mg / kg); le groupe CAF + MPN + AEPG a reçu (CAF+ 9 mg / kg+250 mg / kg respectivement); le groupe CAF + MPN + ALN (CAF+ 9 mg / kg+2 mg / kg respectivement). Après six semaines de traitement, les animaux ont été pesés puis sacrifiés. Le contenu minéral de la 1^{ère} vertèbre lombaire (L1) a été évalué. Des coupes histologiques en série des lombaires (L2-3) et du foie ont été réalisées avec une épaisseur de 5 µm. Nos données ont montré que la teneur en calcium et en phosphore diminue dans les groupes MPN. Par contre dans les groupes AEPG, CAF et ALN les désordres phosphocalcique induits par les glucocorticoïdes semblent se corriger. Nous avons noté la présence d'altérations histopathologiques importantes au niveau du foie signant une stéatose hépatique dans les groupes CAF et CAF + MPN; ces lésions semblent s'estomper par AEPG. Les groupes recevant CAF et MPN montrent une perte osseuse et une diminution de l'os trabéculaire lombaire. Dans notre recherche, les groupes CAF + MPN + ALN et CAF + MPN + AEPG ont montré une amélioration appréciable de l'os trabéculaire lombaire. AEPG ainsi que ALN, ont montré un effet bénéfique sur la fragilité osseuse induite par le traitement à la méthylprednisolone.

En conclusion on peut dire que le *Pennisetum glaucum* une plante ethnopharmacologique, peut être utilisée ou associée au traitement de l'ostéoporose et à la prévention de la fragilité osseuse.

Mots clés : *Pennisetum glaucum*; vertèbre lombaire ; régime cafétéria ; glucocorticoïdes ; alendronate ; rat.

Comparative effect of *Pennisetum glaucum* and alendronate on biochemical and histological analyses of lumbar vertebrae and liver for rats fed cafeteria diet associated with glucocorticoid therapy

Kaddafi ALI^{1,2*}, Bouchra MEDDAH², Riadh BADRAOUI³, Omar ELBLIDI¹, Yahia CHERRAH², Omar CHOKAIRI¹, Malika BARKIYOU¹

1. Laboratory of histology, embryology and cytogenetics, Faculty of medicine and pharmacy, Mohammed V University – Rabat, Morocco, Av. Mohammed Belarabi Elalaoui, BP: 6203 Rabat-Instituts, Rabat, Morocco
2. Laboratory of pharmacology and toxicology, pharmacokinetic Research Team, Faculty of medicine and pharmacy, University of Mohammed V – Rabat. Av. Mohammed Belarabi Elalaoui, BP: 6203 Rabat-Instituts, Morocco
3. Laboratory of histology, embryology, Faculty of medicine, Sfax University, Av Majida Boulila , Sfax 3029, Tunisia

Received 16 Dec 2016,
Revised 13 May 2017,
Accepted 15 May 2017

Keywords

- ✓ *Pennisetum glaucum*;
- ✓ lumbar vertebrae;
- ✓ cafeteria diet;
- ✓ Glucocorticoid;
- ✓ Alendronate
- ✓ rat

A A Kaddafi
ka.ali20@yahoo.fr
ali.kaddafi@um5s.net.ma

+33605795272

Abstract

Glucocorticoid therapy causes serious side effects, including osteoporosis, growth delay, bone fragility, and increasing bone fractures. The purpose of this study is to evaluate the effect of aqueous extract of *Pennisetum glaucum* (AEPG) and alendronate (ALN) on lumbar vertebrae in rats fed cafeteria (CAF) diet associated with methylprednisolone (MPN), a glucocorticoid widely used in therapy. Thirty six Wistar rats were randomized into six groups of six animals each: control group received standard diet for rats; CAF group received cafeteria diet; CAF+MPN group received CAF+MPN (9 mg/kg body weight intraperitoneal); CAF+AEPG group received CAF+AEPG (250 mg/kg); CAF+MPN+AEPG group received (CAF, 9 mg/kg, 250 mg/kg respectively); CAF+MPN+ALN group (CAF, 9 mg/kg, 2 mg/kg respectively). After six weeks of treatment, animals were weighted and sacrificed. Lumbar (L₁) mineral content was assessed. Lumbar (L_{2,3}) and liver serial sections of 5 μm thicknesses were cut for pathology. Our data showed that calcium and phosphorus content decreased in MPN groups. AEPG, CAF and ALN seem to correct glucocorticoid therapy phosphocalcic disorders. We found significant histopathological alterations signing a hepato-steatosis in both CAF and CAF+MPN groups; alterations healed by AEPG. The groups receiving CAF and MPN show bone loss, and decreased lumbar trabecular bone. In our research CAF+MPN+ALN and CAF+MPN+AEPG groups showed a greater improvement of lumbar trabecular bone. AEPG demonstrated, as well as ALN, a beneficial effect on bone fragility induced by methylprednisolone treatment. *Pennisetum glaucum*, an ethnopharmacological plant, may be used or associated in osteoporosis treatment and bone fragility prevention.

1. Introduction

Bone is a multicomposite material that consists of cells, extracellular organic components (collagen and non-collagenous matrix protein) and nonorganic components (calcium hydroxyapatite) [1]. Glucocorticoids are important in the therapy of asthma, chronic diseases, inflammatory and rheumatoid arthritis [2, 3]. It is generally demonstrated that glucocorticoid treatment causes many complications. It has been known that glucocorticoid (GC) therapy increase risk for developing osteoporosis [4]. Osteoporosis is defined by the World Health organization (WHO) as a disease characterized by low bone mass and microarchitectural deterioration of bone tissue, leading to enhanced bone fragility and a consequent increase in fracture risk, it is a major health problem in the worldwide [5]. Risk of vertebral fracture caused by glucocorticoid-induced osteoporosis depends with the therapy dose [6]. However glucocorticoid therapy is not the only contributor of bone disorders. Other risk factors can be implicated including imbalanced foods. Thus, high fat diet has a great risk for bone fragility fractures [7-9].

Bisphosphonates (BP) are widely used in therapy for the prevention and treatment of glucocorticoid-induced bone loss at the lumbar spine [10]. Several studies showed that BP can preserve bone mass and reduce the incidence of vertebral fractures for rheumatic patients [11]. The combination treatment GC and BP decreases

risk of vertebral fractures [10]. It is widely reported that alendronate, a BP is used to prevent glucocorticoid-induced osteoporosis [12].

In folk medicine various plants extracts has been found useful for their therapeutic effect on traumatism and bone fractures. Pearl millet (*Pennisetum glaucum* L.) belongs to the family of Poaceae. It is a road nutritionally and pharmacologically vegetable grows in several countries. In Moroccan ethnopharmacology, pearl millet is used as treatment for trauma, pain and bone fractures, but it has not been evaluated scientifically. The purpose of this study is to evaluate the effect of aqueous extract of *Pennisetum glaucum* (AEPG) and alendronate (ALN) on lumbar vertebrae in rats fed high calorie diet associated with methylprednisolone (MPN).

2. Materials and methods

2.1. Animals

The 6-week-old Wistar rats (50 – 60 g) were used for these experiments respecting all the Rabat Medical Pharmacy School. They were housed three per plastic cages (42 × 26 × 18 cm) in a room at 25° C controlled temperature, humidity relative of 55% and having in 12 h light/ 12 h dark cycle. All animals were provided with water and standard diet ad libitum and allowed to acclimate for one week. All procedures performed throughout the experiment conformed to the guidelines and the Council instructions about the protection of living animal used in scientific investigations.

2.2. Fat diet: Cafeteria diet

The cafeteria diet (CAF) selected, providing modified versions of Harris (1993) high fat diet [13]. It consisted of 3 variants: (i) condensed milk + bread + peanuts + pellet chow (4:1:4:1), chocolate + biscuits + dried coconut + pellet chow (3:2:4:1), and cheese + boiled potatoes + beef tallow + pellet chow (4:2:4:1). The different variants were presented on alternate days throughout the treatment period [14].

2.3. Sample preparation plant

Whole grains of pearl millet (*Pennisetum glaucum* L.) were obtained from Rabat herbalists (Morocco). The grains identified by the botanic department of the National Scientific Institute, dried at room temperature and grounded to obtain a fine powder using an electric blender. For the aqueous extract of *Pennisetum glaucum* (AEPG), 1 kg of fine powder was mixed with distilled water (3 volumes) in a glass jar and left for 2 days at room temperature in an orbital digital agitator (Rotatest 560VIT. 15-300 T/MIN). The solvent was filtered through Whatman pleated filter paper. The filtrate was concentrated under reduced pressure using a rotary vacuum evaporator [15] and stored at 4°C until further used.

2.4. Experimental protocol

The animals were randomly assigned and divided into six groups (n = 6) for six weeks. All the experiments were conducted between 10:00 and 12:00 hour, and various products were tested as follows: control group fed on standard diet, cafeteria group nourished with cafeteria diet (CAF), CAF+MPN group received CAF + MPN (9 mg/kg b.w, intraperitoneal (ip)), CAF+AEPG group received CAF+AEPG (250 mg/kg b.w, per os (po)), CAF+MPN+AEPG group received [CAF, MPN (9 mg/kg ip), AEPG (250 mg/kg b.w, po)], CAF+MPN+ALN group received [CAF+ MPN (9 mg/kg ip) + ALN (2 mg/kg b.w, po) respectively].

The AEPG was suspended in distilled water and administered orally for 5 days/week at a constant volume (250 mg/kg b.w.) [15]. At the end of the 6-week experimentation, all rats were weighed and anesthetized using an overdose of diethyl ether then sacrificed.

2.5. Body weight and macroscopical parameters

We weighted the animals at the initial of experimentation and after six weeks of treatment. Then after sacrifice, all lumbar vertebrae were removed and cleaned of all soft tissue. The bones were immediately weighted, with an electronic balance to receive wet bone weight (WW) and their length and width were measured by calliper [16], and fixed in 10% neutral buffered formalin.

2.6. Lumbar mineral analysis

The lumbar (L1) was cleaned of muscular and conjunctive tissues and weighted to determine the wet bone weight (WW). Lumbar (L₁) was placed in an incubator (70°C) for 48 hours, and weighted to determinate the dried weight (DW) for water content percentage (% water composition = [(WW-DW)/WW]×100). After recording of dry weights, the bones were digested by placing them in solution of 5 mL concentrated nitric acid (HNO₃), 3 mL 70% perchloric acid (HClO₄) and 2 mL 35% hydrogen peroxide and microwaving at 180 PSI

and 180°C [17]. Mineral concentrations were measured by inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy (ICP-AES, Horiba, JobinYvon Ultima 2, French).

2.7. Histological evaluation

Lumbar vertebrae (L₂-L₃) and liver were fixed in 10 % neutral-buffered formalin for assess histology tissues. After bone decalcification in 5% nitric acid for 27 days, the samples were dehydrated by graded series of alcohols (Schrlau, Scharlab S.L, Spain) from 50%, 70%, 80%, 90%, 95%, 100%. The specimens were cleared and impregnate in Toluene (Prolabo, Analo R Normapur, VWR International SAS, French). Following dehydration, the bone and liver samples were embedded in paraffin and 5 µm thick slices were taken from the length, and hemalun hetoxilin, in addition to the coloring of Manson's Trichrome. The slides were observed by light microscope (Leica L 2500 Microsystems, Germany) [18] at staining (200× magnification). We used the LAS EZ software version 3.0 to explore the pictures.

2.8. Scanning electron microscopy

Bone structure was evaluated by scanning electronic microscopy. After fixation and un decalcified lumbar (L₄) samples were dehydrated through graded series (70%, 90%, 95%, 100%) of alcohol [19], and then evaluated in environment SEM operating (Philips XL series, FEI Quanta 200) at 30 kV, images (500× magnifications) and 200.0 µm.

2.9. Statistical analysis

Data was presented as the mean ± SEM for ten rats per group (n = 6). Multiple comparisons were analyzed between groups using one way analysis of variance (ANOVA) and Bonferroni's multiple comparison tests. Significance was established at p<0.05 comparing all treatment groups to control. Data analyses were performed using Graph Pad Prism, version 6.

3. Results and discussion

3.1. Body weight and macroscopical parameters

The present study is carried out to evaluate the extract aqueous of pearl millet effect compared with alendronate in rats fed on cafeteria diet associated with methylprednisolone. Glucocorticoids remain an effective therapeutic option commonly used by clinicians and researches in the treatments of many inflammatory and autoimmune diseases [1], but sides' effects are observed with this therapy. Table 1 contains the main values of the initial and final body weight (g) of rats after six weeks of treatment;

Table 1: Effects of PG and ALN on initial and final body weight in experimental rats. Rats were weighed three times week for evaluate the dose administration throughout the 6 weeks course of the treatment.

Groups	Initial body weight (g)	Final body weight (g)
Control	57.00	117.12
Untreated CAF group	57.47	171.40***
CAF+MPN (9 mg/kg b.w)	57.51	129.47
CAF+AEPG (250 mg/kg b.w)	57.29	159.88**
CAF+MPN (9 mg/kg b.w) +AEPG (250 mg/kg b.w)	57.10	129.67
CAF+MPN (9 mg/kg b.w) + ALN (2 mg/kg b.w)	57.77	116.48

*p<0.05 control group

Results showed no significant differences in initial body weight between groups. We revealed that the body mass progressively increased in rats fed cafeteria diet (p<0.001) and CAF+AEPG (p<0.01) compared to the control group, and decreased in MPN groups compared to CAF group. This last result is confirmed by some authors who reported that methylprednisolone attenuated the increase in body mass [20].

The lumbar vertebrae (L₁₋₅) weight and length; and also lumbar (L₁) water content didn't significant increase in CAF and CAF+AEPG groups compared to other groups (figure 1, A, C, and D). Our data showed that the lumbar weight moderately decreased in groups treated with methylprednisolone compared to CAF group (figure

1, graph A). It has been well reported that steroids including GC, suppressed growth by inhibition of growth hormone or somatomedin and affect calcium and phosphorus metabolism [21].

In this study, we assessed the effect of AEPG and ALN on the hepatic tissues for rats fed cafeteria diet and administered intramuscular methylprednisolone during thirty six weeks of treatments. We measured the liver weight of all animals. The MPN therapy significantly decrease the liver weight compared to control and CAF groups (graph B). The liver weight significantly diminished also in CAF+MPN+ALN group compared to the CAF+MPN group ($p < 0.5$)

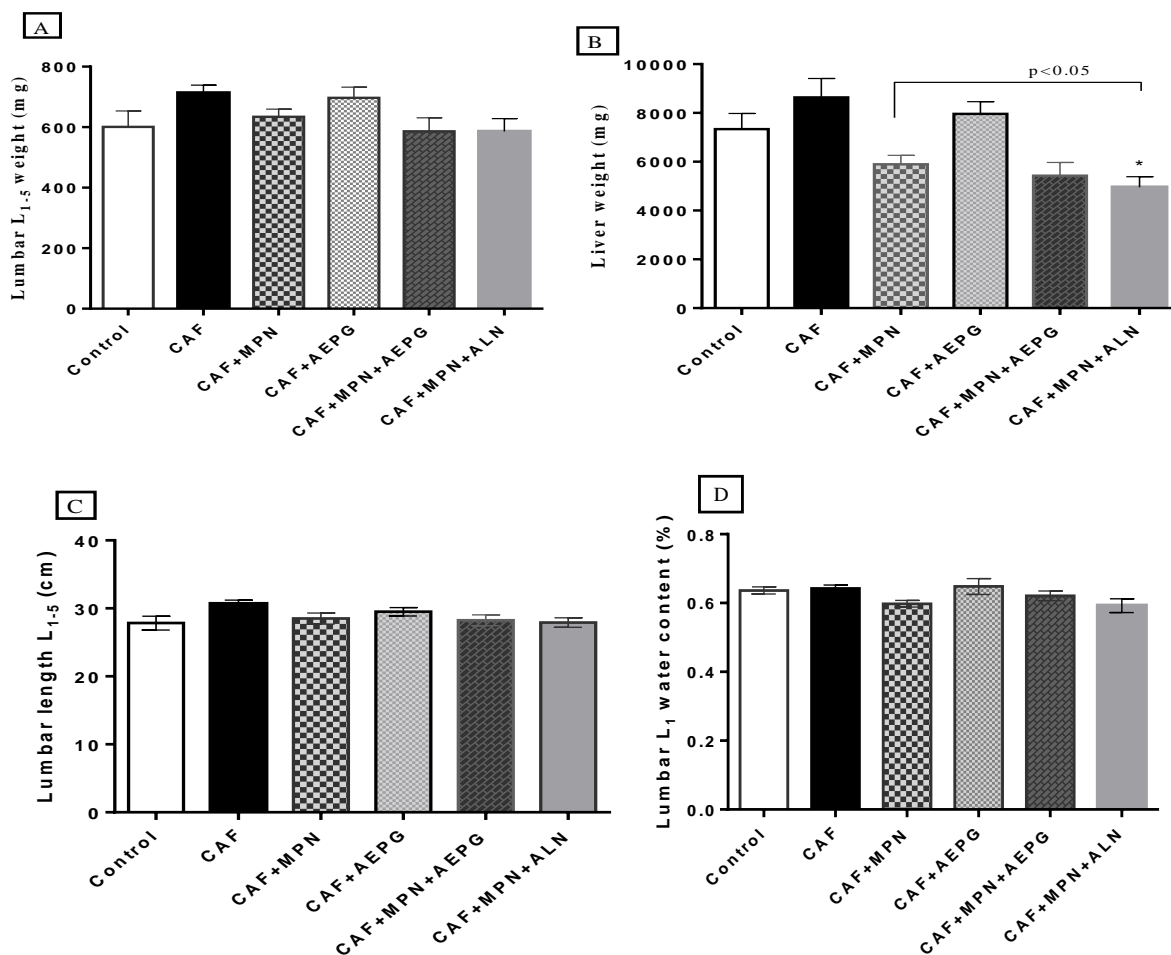


Figure 1: Effects of AEPG and ALN on lumbar vertebrae weight (A), liver weight (B), lumbar vertebrae length (C) and lumbar vertebrae water content (D) exposed to cafeteria diet, 9 mg/kg of methylprednisolone, 250 mg/kg of AEPG and 2mg/kg of alendronate and the control rats. CAF: cafeteria diet, GC: glucocorticoid, PG: *Pennisetum glaucum*, ALN: alendronate.

3.2. Mineral concentrations

Bone strength is characterized by degree of bone mineralization [22]. Bone wet weight and calcium content decreased in ovariectomy which decrease estrogenic activity and affect the bone mass and constituency calcium and zinc concentration [23]. Similar results can be observed in bone tissue in rats treated by GC. In this study (table 2), we observed that the calcium content decreased in MPN groups. The decrease in the calcium content in MPN groups can be explained by decreased intestinal calcium absorption, and increased renal calcium clearance [24]. We also noted that calcium and phosphorus content of lumbar vertebrae increased in groups treated with CAF+AEPG and CAF compared to groups treated with MPN (table 2). Nevertheless, we observed no significant differences increase in CAF+MPN+AEPG and CAF+MPN+ALN groups compared to the control group. Our data showed that cafeteria diet increased calcium and phosphorus content in lumbar and seem to attenuate corticosteroid effect on phosphocalcic disorders in this present study.

In addition, we didn't note significant changes in other minerals content, except manganese which shows a significant decrease in both CAF+MPN+AEPG and CAF+MPN+ALN groups compared to control group.

Table 2: Bone mineral composition in lumbar vertebrae following 9 mg/kg methylprednisolone, 250 mg/kg of AEPG, and 2mg/kg of ALN treatment for 6 weeks (mean \pm SEM)

Parameters	Control	CAF	CAF+MPN	CAF+AEPG	CAF+MPN+AEPG	CAF+MPN+ALN
Ca (%)	15.47 \pm 0.12	42.02 \pm 9.93	14.23 \pm 0.22	36.89 \pm 15.26	15.45 \pm 0.45	15.93 \pm 0.73
Mg (%)	0.38 \pm 0.00	0.67 \pm 0.17	0.34 \pm 0.00 ^a	0.73 \pm 0.27	0.34 \pm 0.01	0.32 \pm 0.01 ^{ac}
P (%)	13.25 \pm 0.67	21.64 \pm 10.02	12.13 \pm 0.68	26.78 \pm 10.45	12.96 \pm 0.24 ^a	12.34 \pm 0.38
Fe (%)	0.02 \pm 0.01	0.03 \pm 0.00	0.04 \pm 0.01	0.04 \pm 0.01	0.016 \pm 0.00 ^b	0.02 \pm 0.00 ^{be}
Zn (%)	0.40 \pm 0.00	0.03 \pm 0.01	0.02 \pm 0.00 ^a	0.05 \pm 0.01	0.05 \pm 0.02	0.03 \pm 0.00 ^a
Mn (\leq mg/L)	3.12 \pm 0.09	3.23 \pm 0.22	3.62 \pm 0.12	3.46 \pm 0.18	4.41 \pm 0.09 ^a	4.36 \pm 0.08 ^{abd}
Ca/P (%)	1.18 \pm 0.50	0.98 \pm 0.24	1.33 \pm 0.13	1.19 \pm 0.08	2.32 \pm 0.73	1.29 \pm 0.02

Data are expressed as mean \pm SEM. An ANOVA with Bonferroni's test. Control, CAF: cafeteria diet, CAF+MPN: cafeteria + glucocorticoid, CAF+AEPG: cafeteria + *Pennisetum glaucum*, CAF+MPN+AEPG: cafeteria diet + glucocorticoid + *Pennisetum glaucum*, CAF+MPN+ALN: cafeteria diet + *Pennisetum glaucum* + alendronate. Ca: calcium, Mg: magnesium, P: phosphorus, Fe: iron, Zn: zinc, Mn: manganese, Ca/P: ratio calcium phosphate.

^ap<0.05 vs control group, ^bp<0.05 vs CAF group, ^cp<0.05 vs CAF + MPN group, ^dp<0.05 vs CAF+AEPG group, ^ep<0.05 vs CAF+MPN+AEPG group.

^ap<0.01, ^ap<0.05 vs CAF+AEPG, CAF+MPN+ALN (Mg) respectively. ^cp<0.01 vs CAF+MPN+ALN, (Mg).

^ap<0.001 vs CAF+AEPG+AEPG, (P).

^bp<0.05, ^bp<0.05 vs CAF+MPN+AEPG, CAF+MPN+ALN, (Fe) respectively, ^cp<0.05 vs CAF+MPN+ALN, (Fe)

^ap<0.01, ^ap<0.05 vs CAF+MPN, CAF+MPN+ALN, (Zn) respectively.

^ap<0.01 vs CAF+MPN+AEPG, CAF+MPN+ALN (Mn) respectively, ^bp<0.01 vs CAF+MPN+ALN (Mn),

^dp<0.05 vs CAF+MPN+ALN (Mn).

3.3. Histological evaluation

Several authors reported that glucocorticoid has been implicated in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease [25, 26]. We found significant histopathological alterations associated with several fat vacuoles (figure 2, b1 and c1) observed in both CAF and CAF+MPN groups compared with other groups which indicate the development of hepatosteatosis. We also observed healthy livers with no steatosis and histologically normal hepatic cords and parenchyma in control group, AEPG and ALN groups. This data suggests that AEPG was benefic to correct the hepatic cells and decrease microvesicular steatosis. Brante et al reported that cafeteria diet caused the most extensive steatosis and distorted cord architecture of liver [27]. The liver disease is part of the potential causes for secondary osteoporosis [28]. Bone disease management for liver patients is addressed to reduce or avoid the risk factors for osteoporosis and fracture [29].

Several animal studies focused on oral glucocorticoid treatment as causal factor for the bone parameters and structure alteration. It was also noted that oral glucocorticoid therapy increased the risk of fractures particularly those of the vertebral body [30]. The present study is the first to evaluate and compare the effects of pearl millet and alendronate in lumbar vertebrae of rats fed on cafeteria diet associated with glucocorticoid. The groups receiving CAF and MPN pharmacological doses (9 mg/kg/b.w) show bone loss, and decreased lumbar trabecular bone (figure 3, B1 and C1). We noted equally that the number of osteocytes lacunae significantly decreased in MPN group compared to the control group. Our results also showed that bone marrow was decreased to favor the increase of fat microvacuoles in CAF and CAF-MPN groups. Banu et al reported similar results [31]. Deterioration of the trabecular architecture has been implicated in decreased bone strength and increased fracture incidence in humans [32].

Bisphosphonates such alendronate prevent bone loss at both lumbar spine and hip, and can further reduce the risk of vertebral fractures [33]. It has now been widely reported that alendronate can contribute to a higher level of resistance to induced-osteoporosis factors [34]. In other studies, long-term treatment of human and nonhuman

primates with alendronate has shown increase wall thickness, reduce bone resorption and prevent glucocorticoid-induced osteoporosis [35, 36].

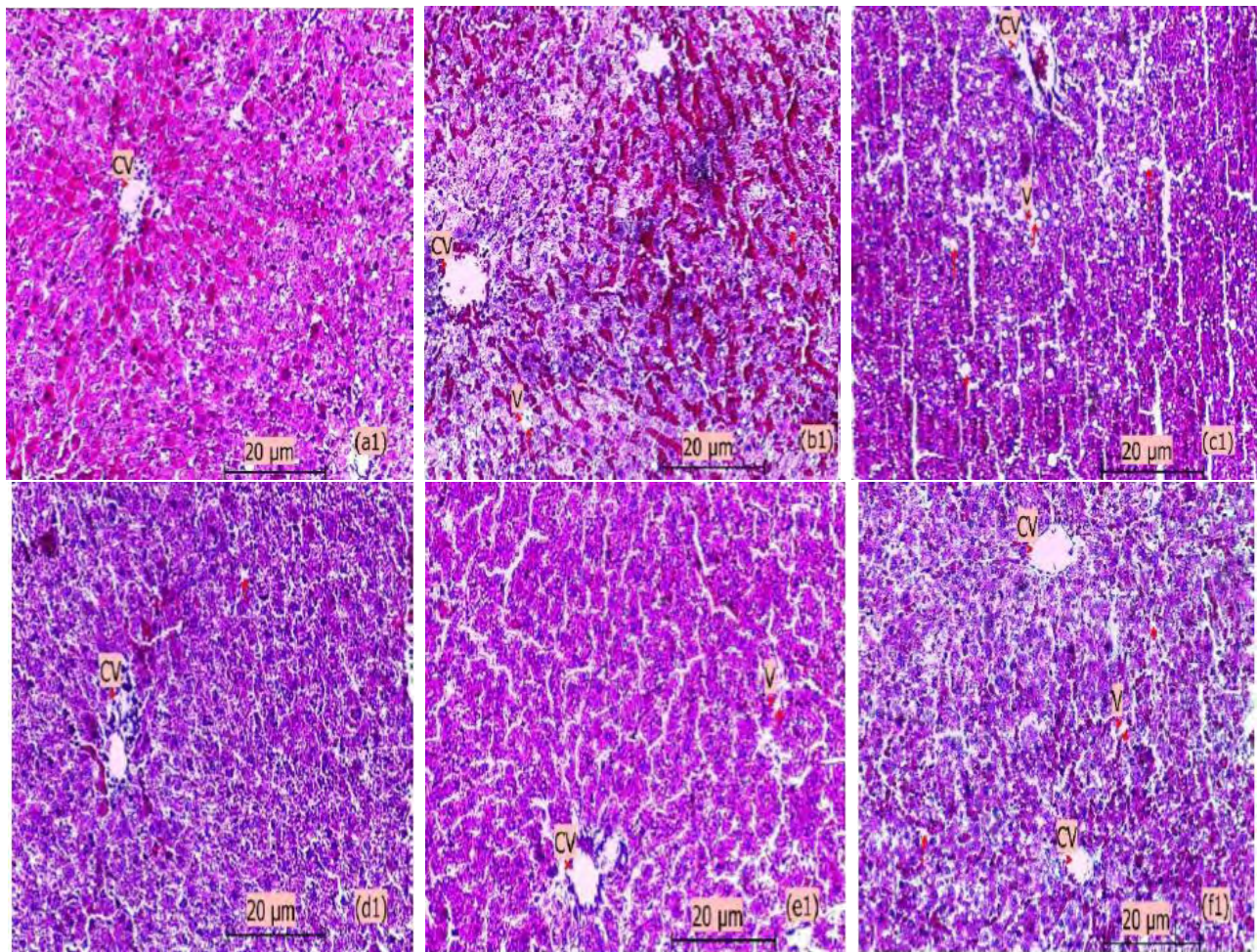


Figure 2. Effects of AEPG and ALN on liver of rats feed cafeteria diet and methylprednisolone. Manson's trichrome staining (200 × magnifications). Scale bar 20 µm: (a1) control group, (b1) CAF group, (c1) CAF+GC group, (d1) CAF+AEPG group, (e1) CAF+MPN+AEPG group, (f1) CAF+MPN+ALN group. The red arrow heads indicate fat vacuole. CV: central vein, V: vacuole.

In our research we noted that histological evaluation in CAF-MPN-ALN and CAF-MPN-AEPG groups showed a greater improvement of lumbar trabecular bone and osteocyte lacunae compared to CAF and CAF+MPN groups. In this regard, we noted that the AEPG increased lumbar trabecular bone and attenuated bone erosion, which shows a beneficial effect on bone fragility induced by methylprednisolone treatment.

3.4. Scanning electron microscopy evaluation

Scanning electronic microscopy appreciates the bone matrix quality [37]. It shows that osteocysts lacunae orientations and lamellae structures are less ordered and aligned in rats fed on hyperlipidic diet [38].

In this study, we examined the samples by scanning electron microscopy. We found that CAF diet and CAF+MPN diminished the quality of bone structure, and increased bone alterations compared to the control group. At high magnification microfissures were observed at the surface of cortical bone in CAF+MPN group compared to control group. We noted that AEPG administration showed an increased structure area of trabecular bone and more volume thickness compared with the CAF+MPN group. This improvement was also observed in trabecular bone in alendronate treatment group compared to the CAF and CAF+MPN groups respectively (figure 4, F). It seems that AEPG prevents MPN-induced alterations in bone morphology. Our results reported that the comparison between AEPG and ALN showed no significant difference in bone improvement. We noted that methylprednisolone accelerate the bone marrow alteration in rat fed cafeteria diet. This phenomenon seems improve after AEPG and ALN treatment.

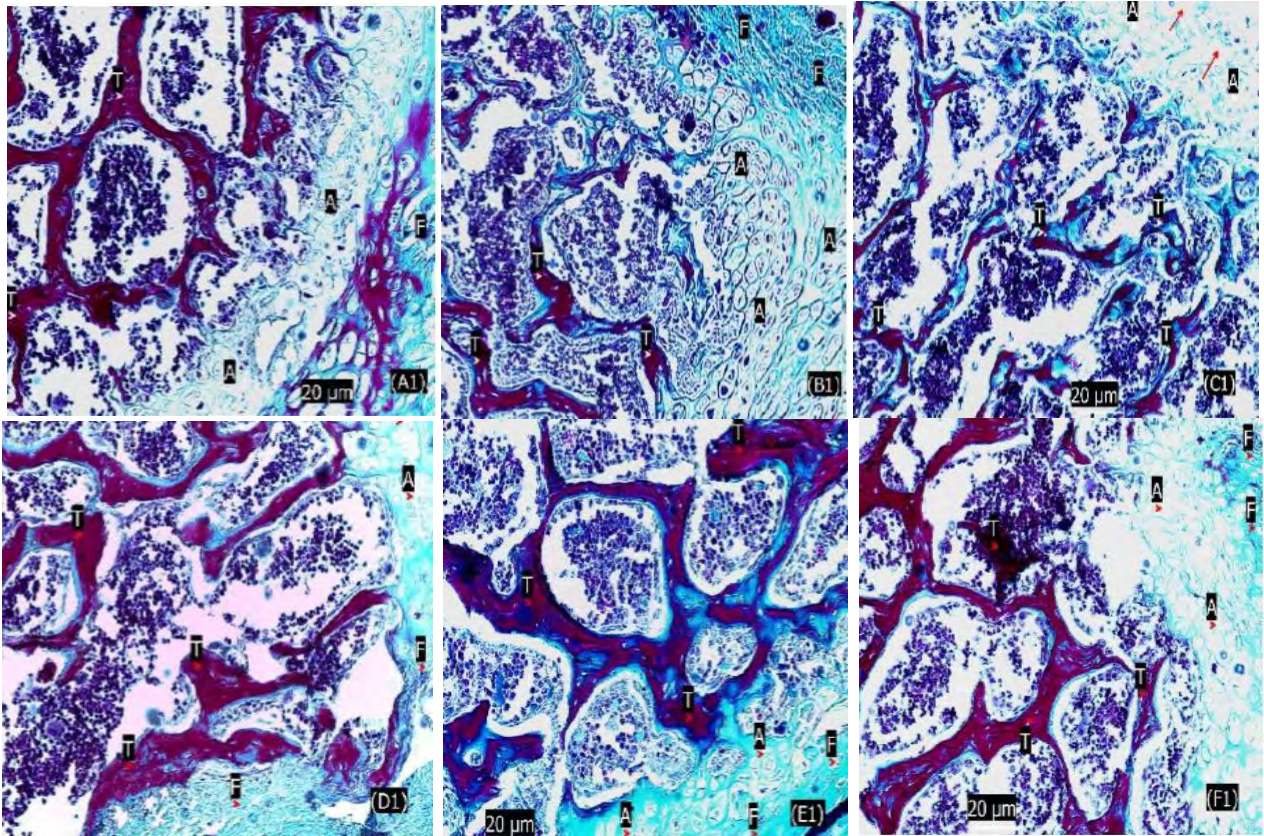


Figure 3: Effects of AEPG and ALN on lumbar vertebrae of rats feed cafeteria diet and methylprednisolone. Manson's trichrome staining (200 × magnifications). Scale bar 20 μm: (A1) control group, (B1) CAF group, (C1) CAF+MPN group, (D1) CAF+AEPG group, (E1) CAF+MPN+AEPG group, (F1) CAF+MPN+ALN group. The red arrow heads indicate collagen fiber. T: trabecular bone, F: collagen fiber, A: nascent bone

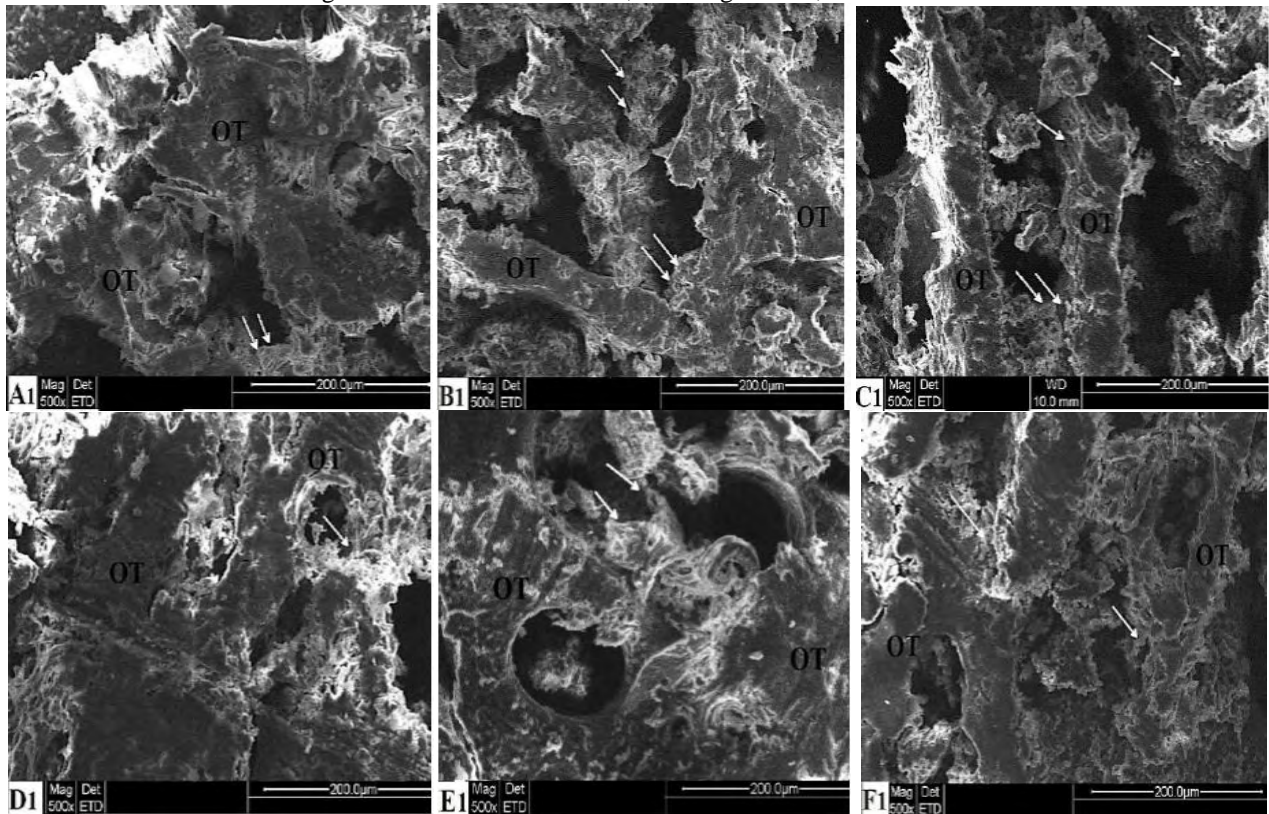


Figure 4: Effects of AEPG and ALN on lumbar vertebrae of rat feed cafeteria diet and methylprednisolone. (A) Control group; (B) CAF group; (C) CAF+MPN group; (D) CD+AEPG group; (E) CAF+MPN+AEPG group; (F) CAF+MPN+ALN group. Scanning electronic microscopy images (500× magnifications); OT: trabecular. White arrows denote the remodeling areas defect.

Conclusion

According to the findings of this study, it is evident that *Pennisetum glaucum* has a beneficial effect on lumbar vertebrae osteoporosis induced by glucocorticoid therapy.

By this work, we have contributed to bring scientific proves of antiporotical activity of AEPG seed which is empirically used in traditional medicine. Furthermore, AEPG shows a similar effect to a bisphosphonate widely used to prevent and slow the progress of bone loss and fractures: the Alendronate and AEPG could be used as a new therapeutic pathway, inexpensive, natural alternative without adverse effects, in the bone loss and osteoporosis treatment new strategy and prevention.

Acknowledgements

This work was supported by the Mohammed V University, Medicine and pharmacy faculty of Rabat, Morocco. The authors express their sincere thanks for this support

Conflict of Interest statement

The authors report no conflict interest.

References

1. Buehring B., Viswanathan R., Binkley N., Busse W., *J. Allergy Clin. Immunol.* 132 (2013) 1019.
2. Ohta K., Ichinose M., Nagase H., Yamaguchi M., Sugiura H., Tohda Y., Yamauchi K., Adachi M., Akiyama K. Japanese Society of Allergology., *Allergol. Int.* 62 (2014) 293.
3. Yazdany J., Tonner C., Schmajuk G., Lin G. A., Trivedi A. N., *Arthritis. Care. Res.* 66 (2014) 1447.
4. Kanis J.A., Johansson H., Oden A., Johnell O., de Laet C., Melton III L.J., Tenenhouse A., Reeve J., Silman A.J., Pols H.A., Eisman J.A., McCloskey E.V., Mellstrom D., *J. Bone Miner. Res.* 19 (2004) 893.
5. Bonjour J.P., Ammann P., Rizzoli R., *Osteoporos. Int.* 9 (1999) 379.
6. Leblanc C. M., Ma J., Scuccimarri R., Cabral D.A., Dent P.B., Ellsworth J.E., Houghton K., Huber A.M., Jurencak R., Lang B.A., Larche M., Lentle B., Matzinger M. A., Miettunen P. M., Oen K., Roth J., Saint-Cyr C., Shenouda N., Taljaard M., Ward LM. Canadian STOPP Consortium., *J. Bone Miner. Res.* 30 (2015) 1667.
7. Ward W.E., Kim S., Robert Bruce W. Br., *J. Nutr.* 90 (2003) 589.
8. Martínez-Ramírez M.J., Palma S., Martínez-González M.A., Delgado-Martínez A.D., de la Fuente C., Delgado-Rodríguez M., *Eur. J. Clin. Nutr.* 61 (2007) 1114.
9. Halal G.V., Rahman M., Williams P.J., Fernandes G., *J. Nutr. Biochem.* 21 (2010)1162.
10. Crandall C.J., Newberry S., Diamant A., Lim Y.W., Gellad W.F., Suttorp M.J., Motala A., Ewing B., Roth B., Shanman R., Timmer M., Shekelle P.G., *AHRQ Comparative Effectiveness Review.* 53 (2012). 12-EHC023-EF.
11. Feng Z., Zeng S., Wang Y., Zheng Z., Chen Z., *PLoS One* 8 (2013) e80890.
12. Uchida K., Nakajima H., Miyazaki T., Yayama T., Kawahara H., Kobayashi S., Tsuchida T., Okazawa H., Fujibayashi Y., Baba H., *J. Nucl. Med.* 50 (2009) 1808.
13. Harris RB., *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 17 (1993) 307.
14. Kamalakkannan S, Rajendran R., Venkatesh R.V., Clayton P., Akbarsha M.A., *J. Nutr. Metab.* (2010) 1.
15. Venkata P. S., Rajesh N., Swapna S., Chippada A. R., *J. Pharm. Chem.* 6 (2012) 36.
16. Brzóska M.M., Majewska K., Moniuszko-Jakoniuk J., *Food Chem. Toxicol.* 43 (2005) 1507.
17. Hakki S.S., Dundar N., Kayis S.A., Hakki E.E., Hamurcu M., Kerimoglu U., Baspinar N., Basoglu A., Nielsen F.H., *J. Trace Elem. Med. Biol.* 27 (2013) 148.
18. Hafezia M, Talebi A. R., Miresmaeili S. M., Sadeghian. F, Fesahat F., *Ceramics International* 39 (2013) 4575.
19. Jimenez-Palomar I., Shipoy A., Shahar R, Barber A.H., *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 5 (2012) 149.
20. Roy B.D., Bourgeois J., Rodriguez C., Payne E., Young K., Shaughnessy S.G., Tarnopulosky M.A., *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* 33 (2008) 1096.
21. Travis L. B., Chesney R., McEnery P., Moel D., Pennisi A., Potter D., Talwalkar Y.B., Wolff E., *Kidney Int.* 14 (1978) 365.

22. Song Q., Sergeev I., *Nutr. Res.* 35 (2014) 146.
23. Mohammad S.I., Maznah I., Mahmud R.B., Esmaille M.F., Zuki A.B., *Clin. Interv. Aging* 8 (2013) 1421.
24. Kuroki Y., Haji K., Kawano S., Kanda F., Takai Y., Kajikawa M., Sugimoto T., *J. Bone Miner. Metab.* 26 (2008) 271.
25. Le Moli R., Baldeschi L., Saeed P., Regensburg N., Mourits M.P., Wiersinga W.M., *Thyroid* 17 (2007) 357.
26. Nasiri M., Nikolaou N., Parajes S., Krone N. P., Valsamakis G., Mastorakos G., Hughes B., Taylor A., Bujalska I. J., Gathercole L. L., Tomlinson J. W., *Endocrinology* 158 (2015) 2863.
27. Brante P. S., Amanda. M. V., Helena M. W., Alex J. F., Michael J. M., Patrick T. F., Christopher B. N., Liza M., *Obesity* 19 (2011) 1109.
28. Khosla S., Amin S., Orwoll E., *Endocr. Rev.* 29 (2008) 441.
29. Guañabens N., Parés A., *Clin. Res. Hepatol. Gastroenterol.* 35 (2011) 438.
30. Van Staa T.P., Leufkens H.G., Abenhatm L., Zhang B., Cooper C., *J. Bone Miner. Res.* 15 (2000) 993.
31. Kalpakcioglu B. B., Engelke K., Genant H.K., *Bone* 48 (2011) 1221.
32. Kim H.K., Kim M., Leem K.H., *Molecules* 18 (2013) 15474.
33. Feng Z, Zeng S, Wang Y, Zheng Z, Chen Z., *PLoS One* 8 (2013) e80890.
34. Coaccioli S., Celi G., Crapa M.E., Masia F., Brandi M.L., *Clin. Cases Miner. Bone Metab.* 11 (2014) 123.
35. Chavassieux P.M., Ariot M.E., Reda C., Wei L., Yates A.J., Meunier P.J., *J. Clin. Invest.* 100 (1997) 1475.
36. Krause M., Soltau M., Zimmermann E.A., Hahn M., Kornet J., Hapfelmeier A., Breer S., Wulff M.B., Püschel K., Glueer C.C., Amling M., Busse B., *Eur. Cell. Mater.* 28 (2014) 152.
37. Ionova-Martin S.S., Do S.H., Barth H.D., Szadkowska M., Porter A.E., Ager J.W3rd, Ager J.W Jr, Alliston T., Vaisse C., Ritchie R. O., *Bone* 46 (2010) 217.
38. Ionova-Martin S.S., Wade J.M., Tang S., Szadkowska M., Ager J.W3rd, Lane N.E, Yao W, Alliston T., Vaisse C., Ritchie R.O., *Bone* 22 (2011) 2283.

(2017) ; <http://www.jmaterenvironsci.com>

Conclusion générale

La fragilité osseuse est un véritable problème de santé publique. En médecine traditionnelle marocaine l'utilisation du mil à chandelle occupe une place privilégiée dans le traitement et la prévention de la fragilité osseuse et les fractures. Les travaux que nous présentons se sont attelés à démontrer la véracité de ces allégations et confirment bien l'intérêt du mil à chandelle comme moyen de prévention et de traitement de ce type de pathologies.

Notre travail est un des premiers travaux dans son genre. Son originalité tient au fait qu'il comporte un volet histologique et ultra structural. Il consiste à comparer les effets de cette plante, avec une drogue réputée pour son activité antiostéoporotique (l'alendronate), en analysant entre autres examens des coupes histologiques d'os et de tissus impliqués dans le métabolisme osseux.

Dans les deux articles que nous avons publiés, le principe de base est le même. Il consiste à induire la fragilité osseuse dans un échantillon de rats wistar par un régime hypercalorique et la corticothérapie injectable. Nous avons ensuite répartis les groupes globalement en deux: l'un recevant l'AEPG et l'autre l'alendronate.

Au terme d'un traitement de 6 semaines, les animaux ont été sacrifiés. Nous nous sommes alors intéressés à des tissus durs correspondant aux mandibules et les vertèbres lombaires, et à des organes d'intérêt : le foie et les glandes salivaires.

Par rapport aux témoins, nous avons noté une correction des désordres biochimiques engendrés par le régime et la corticothérapie, en particulier la teneur en calcium a nettement augmenté sous AEPG bien mieux que sous ALN.

L'analyse histopathologique et la microscopie électronique à balayage utilisées pour analyser la microarchitecture trabéculaire et la qualité osseuse a montré nettement que le régime hypercalorique et les corticostéroïdes altèrent massivement et de façon nette l'architecture de l'os trabéculaire, qui montre des images sous forme de travées érodées, fragmentées et désordonnées. L'administration de l'AEPG a par contre stimulé la réparation des lésions osseuses générées, avec la disparition des zones d'érosion et un effet bénéfique sur la fragilité osseuse. Il est à noter par ailleurs que l'AEPG a montré de meilleurs résultats que l'ALN administré dans les mêmes conditions expérimentales.

L'examen histologique des organes mous d'intérêt révèle que les lésions qui pour la plupart sont de type macro et microvésiculaires sous forme de stéatose hépatique, d'involution graisseuse des glandes salivaires se sont littéralement estompées grâce à l'action de l'AEPG et l'ALN.

Au vu des résultats obtenus, nous pouvons affirmer que l'AEPG représente une excellente alternative pour traiter et prévenir la fragilité osseuse. L'intérêt de cette plante est sa disponibilité, son prix modique et son caractère naturel sans adjuvant ni effets secondaires puisqu'il s'agit d'une plante céréalière consommée par l'homme. Cette plante a montré par ailleurs parfois des résultats significativement supérieurs à l'alendronate. Cependant, il va de soi qu'il y a un véritable besoin de faire des travaux plus approfondis pour connaître les principes actifs, rechercher les niveaux enzymatiques et moléculaires de l'action de ces principes pour pouvoir faire des prescriptions judicieuses et à bon escient. En parallèle, il serait intéressant de faire une enquête épidémiologique, pour connaître son impact sur la fragilité osseuse des populations qui la consomment comme céréale en tenant compte bien entendu d'autres paramètres comme l'ensoleillement. Des travaux similaires ont été réalisés dans les pays asiatiques consommant le soja. En effet aussi bien le soja et le mil contiennent sensiblement en commun certains composés de type phénols, flavonoïdes et des phytostérols dont les phytoestrogènes.

Additif : Extraction et caractérisation simplifiées du collagène de type I solubilisé dans l'acide acétique de la peau de *Solea Solea* et des queues de rat Wistar pour des applications biomédicales et biotechnologiques

Article 3: Simplified Extraction and Characterization of Acetic Acid Solubilized Type I Collagen Derived from *Solea Solea* Skin and Wistar Rat Tails for Biomedical and Biotechnological Applications

O. EL Blidi^{1,2*}, N Elomari¹, Y Kamar-Zaman³, I Chakir¹, A Kaddafi¹, N Lebjar⁴, A Ibrahimi², O Chokairi¹ and M Barkiyoul

1Histology-Embryology & Cytogenetics Laboratory, Mohammed V University, Faculty of Medicine and Pharmacy, Rabat, Morocco

2Laboratory of Medical Biotechnology, Mohammed V University, Faculty of Medicine and Pharmacy, Rabat, Morocco

3Laboratory of Epidemiology and Oro-Facial Health, Mohammed V University, Faculty of dentistry, Rabat, Morocco

4Physico-Chemical Laboratory, Normal School of Technical Education, Rabat, Morocco

Résumé:

Simplified Extraction and Characterization of Acetic Acid Solubilized Type I Collagen Derived from *Solea Solea* Skin and Wistar Rat Tails for Biomedical and Biotechnological Applications

Ce projet de recherche propose une méthode expérimentale pour contrôler les paramètres (concentration d'acide acétique, vitesse de centrifugation et température) pour l'extraction du collagène soluble dans l'acide acétique (AASC) à partir des queues de rat Wistar et de la peau de Sole (*solea solea*). Les résultats ont montré que ces trois variables indépendantes avaient des effets significatifs sur le rendement et les propriétés physico-chimiques de l'AASC. En outre, l'efficacité d'extraction a également été affectée par l'interaction entre ces variables. Les conditions optimales pour un rendement plus élevé d'AASC extrait de la queue de rat, ainsi que les extraits de poissons Sole, étaient: une concentration en acide acétique de 0,1%, une vitesse de centrifugation de 3000 tr / min et une température d'extraction entre 4 et 20 ° C. La caractérisation de l'AASC montre une valeur de pH acceptable (3 à 5), une conductivité électrique et une résistance variable par rapport à la température et exponentiellement avec la concentration en acide acétique. La viscosité relative du AASC dissous dans différentes concentrations d'acide acétique (0,1, 2,9 et 10%) diminue continuellement à mesure que la température augmente de 4 à 50 ° C, indiquant un degré satisfaisant de dénaturation thermique des molécules AASC. Par conséquent, une peau de Sole *Solea*, ainsi que la queue de Wistar Rat, peuvent être utilisées comme sources alternatives de collagène.

Mots clés : *Solea solea*; *biotechnologie*, applications; rats



Simplified Extraction and Characterization of Acetic Acid Solubilized Type I Collagen Derived from *Solea Solea* Skin and Wistar Rat Tails for Biomedical and Biotechnological Applications

OEL Bliidi^{1,2*}, N Elomari¹, Y Kamar-Zaman³, I Chakir¹, A Kaddafi¹, N Lebjari⁴, A Ibrahim², O Chokairi¹ and M Barkiyou¹

¹Histology-Embryology & Cytogenetics Laboratory, Mohammed V University, Faculty of Medicine and Pharmacy, Rabat, Morocco

²Laboratory of Medical Biotechnology, Mohammed V University, Faculty of Medicine and Pharmacy, Rabat, Morocco

³Laboratory of Epidemiology and Oro-Facial Health, Mohammed V University, Faculty of dentistry, Rabat, Morocco

⁴Physico-Chemical Laboratory, Normal School of Technical Education, Rabat, Morocco

ABSTRACT

This research project presents an experimental plan to control the best possible processing parameters (acetic acid concentration, centrifugation speed and temperature) for the extraction of acetic acid soluble collagen (AASC) from the Wistar rat tails and the skin of Sole fish (Solea solea). The results showed that these three independent variables had significant effects on the yield and the physico-chemical properties of AASC. Moreover, the extraction efficiency was also affected by the interaction between these variables. Optimal conditions for a higher yield of AASC extracted from rat tails, as well as the extracted from Sole fish, were: an acetic acid concentration of 0.1%, a centrifugation speed of 3000 rpm and an extraction temperature between 4 and 20°C. The characterization of AASC shows an acceptable pH value (3 to 5), an electrical conductivity and resistance variable relatively to the temperature and exponentially with acetic acid concentration. Relative viscosity of AASC dissolved in different acetic acid concentrations (0.1, 2.9 and 10%) decrease continuously as the temperature increase from 4 to 50°C, indicating a satisfactory degree of thermal denaturation of AASC molecules. Therefore, a skin of Sole solea, as well as Wistar Rat tail, can be used as alternative collagenous sources.

Keywords: *Solea solea*; Biotechnological applications; Sole fish

INTRODUCTION

The collagen protein, as popular biomaterial, can be derived from different animal models, as bovine hide, pig skin, and chicken wastes, but creating much anxiety among health-conscious consumers for the past decades due to the outbreaks of bovine spongiform encephalopathy (BSE), foot-and-mouth disease (FMD), and avian flu. More than these health risks, some kind of extraction are not chosen for social or religious reasons. Hindus do not eat cow-related foods and Muslims consider the pig-related products as non-halal which means being non consumable. Therefore, the marine sources have been paid increasing attention as a potential new collagen source for alimentary and biomedical applications as well as the rat tails for the collagen designated especially for research uses [1,2].

Many studies were done and all these studies demonstrate that fish and rat collagen is certainly able to serve as natural alternative sources to change the commercial collagen, and the most of them have utilized sources such as

skins, bones, and tendons during processing of fishes [3-11] or directly from laboratory rats [12] for collagen extraction. These new extraction methods are relatively difficult and need some high developed technologies to be achieved ; these technologies are not available, generally, in normal laboratories, hence the necessity to find some alternative simplified technique, especially that the fish industry in Morocco knows a considerable development these last years. Same, Wistar rat is very used and popular in the Moroccan laboratories for research applications.

The related literature to the extraction of collagen by different acid concentration and their influence on the yield is relatively limited. There is also neither simplified method on the extraction of native collagen from the skin of Moroccan Sole fish and Wistar rat nor any optimization relying on the centrifugation speed influence in the extraction results. Furthermore, it's known that is relatively expensive this process of extraction, and as consequence the high cost of extracted collagen and the collagen as biomaterial for biomedical and research uses.

The aims of this research are to simplify the type I solubilized collagen extraction from two different sources (Sole fish and Wistar rat) and to describe its physicochemical proprieties in different acetic acid concentrations using different centrifugation speeds.

All the preparative procedures were performed at 4 - 20°C. The methods for extraction of collagen from fish skin and rat tails consisted: 1) skin and tails preparation, 2) removing non-collagenous tissues, 3) solubilizing collagen, 4) centrifuging, 5) concentration and yield measurement before the characterizations of the extracted collagen.

EXPERIMENTAL SECTION

Animals

The study was conducted in accordance with the accepted principals outlined in the "Guide for the care and use laboratory animals" prepared by the National Academy of Sciences and published by the National Health Institute.

Collagen Extraction Preparation

The Sole fish and rat-tails were placed in a bag full of ice, then, at the laboratory, the white skin for Sole fish was cleaned by sharp knife from any attached muscle and scales. The cleaned white skin obtained was cut into fine small pieces (0.5 × 0.5 cm). Then it was placed in 500 ml flask. The rat-tails soaked in ETOH 70% to remove debris, after removing skin from rat tail; the tendon was detached by forceps, scalpel and special piler from rat-tails.

Histological Observation

The skins are cut into pieces (0.5 cm × 0.5 cm) and fixed in buffered formalin (5%) for 24 hours. The specimen is dehydrated in a series of graded ethanol solutions (70%, 80%, 90%, and 100%), toluene by Histokinette and finally embedded in paraffin. The perpendicularly sections (5 µm thick) through the skin surface were cut using a Microtome and mounted onto slides. The slides with the sections are treated with toluene to remove paraffin, rehydrated through graded ethanol solutions, in reverse order (100%, 90%, 80%, and 70%), and stained with Masson's trichrome stain. The stained sections are observed through light microscopy [Mono-Leica microscope] and using color digital camera [Fujifilm Finepix JV 16 MP] at an original magnification of 4, 10 and 40X. Finally the digital images are collected.

Removing Non-Collagenous Tissues

After preparing the Sole fish skin and in order to remove non collagenous substance, the skin was treated with 500 ml of NaOH (0.1 M, pH=12) for 24 hours. The skins become very loose.

The solution was placed on the skin and softly stirred for 5 minutes. The resulting solution was replaced to the fridge for a whole day. After that, the solution was removed by using double filter paper (size 125 mm), and the skin was washed carefully with cold distal water until its pH become neutral. During this step, the skin was washed carefully for four times, using of each wash, 600 ml of cold distaled water. pH measurement was taken after each wash. The skin was washing gently, treated with butyl alcohol (10%, Butanol) for 48 hours. The main reason for this treatment was to eliminate fat tissue from the Sole fish skin. After being placed in the fridge for 24 hours, the solution was removed by using the standard 125 mm double filter paper, and replaced by a new 500 ml of butyl alcohol (10%). The solution was placed in the fridge for another 24 hours.

Solubilizing Collagen

After 2 days of butyl alcohol buffer (Butanol), the solution with skin was filtered by using double filter paper (size 125 mm). The skin was washed in cold distilled water thoroughly and gently. In each time, the skin was washed for four times with 600ml of cold distilled water. After the washing, the skin was suspended in 462 ml (66 ml/g) of 0.1, 2.9 or 10% acetic acid with stirred magnetic bar agitation at ambient temperature degree for three days. The system

was composed especially in order to keep a permanent agitation changing the temperature by adding cold water to the closed system checking usually the temperature variation.

Centrifuging Collagen

After three days of acetic acid suspension, the solution was filtered by using 125 mm double filter papers. Then, the solution (11 ml of solubilized collagen/every 15 ml tube) was centrifuged by centrifuge machine [Jouan centrifuge] with speeds of 3000, 4000, or 5000 rpm for 2 hours (in the ambient temperature). The solution obtained, from each centrifuged 10 ml of supernatant was collected in a tube of 15 ml (Figure 1).

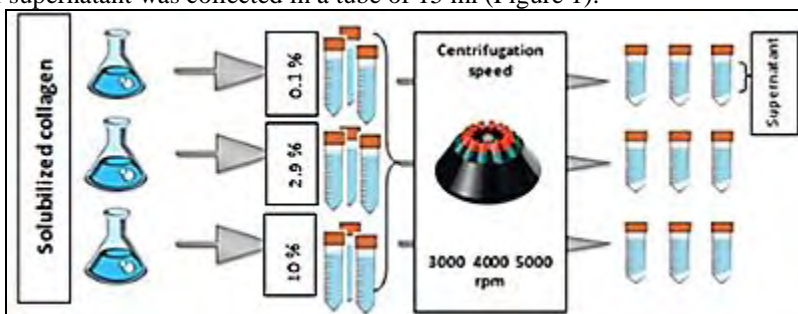


Figure 1: Centrifugation procedure

Yield Measurement

The whole low-cost extraction process was performed. The final sterile solution takes around 2–3 weeks. The result solutions were grouped aseptically condition according to collagen sources, acetic acid concentration and centrifugation speed. The Sole fish skin and rat-tails extracted collagen yields and concentrations were calculated by taking a sterile tissue culture dish 35×10 mm and measuring its weight. A small amount of extracted collagen was placed on the dish until the solution evaporated on ambient temperature. The weight of the collagen was taken, and the collagen concentration was deduced by dividing the weight of collagen on the volume of the solution used.

Collagen Yield Measurement

The yield of the resulted acid soluble collagen was deduced using the following equation:

$$\text{Yield of collagen (\%)} = [\text{weight of collagen (g)} / \text{weight of skin (g)}] \times 100\%$$

Checking Type I Efficiency

Preparing fibrillar collagen matrices using basic solution:

Firstly, all buffer used are frozen: 10X DPBS (pH 7.4), acid solubilized rat-tails, tendon and Sole fish skin collagen stock solution, NaHCO_3 (Sodium bicarbonate to neutralize the pH), distilled water and sterile tube (15 ml). The collagen gel and check efficiency was performed by mixing on sterile tube 50 μl of 10X DPBS, 250 μl of collagen stock solution and 200 μl of distilled water. The mixture was vortexed [Vibrofix], pipetting into sterile wells and checked pH, adjusted by NaHCO_3 . Tissue culture dish 35×10 mm was incubated in 37°C or 4°C . The gel will be removed from solution carelessly by sterile blue pipette. And before leaving the wells dries under the hood until being able to see a white haze (if fibril matrix has formed), which be observed under phase contrast microscopy [Nikon].

Collagen gelation: Ammonia hydroxide method:

In aseptic conditions, ammonia vapor chamber was prepared by taping a 2 inch sterile gauze sponge to the inside a 150 mm Petri dish. The gauze was saturated with ammonium hydroxide. Aseptically, 0.1 μl volume of type I AASC was added to each numerated 0.1 μl well of the polystyrene microtitre plate (12 well/ microtitre), spreading with sterile pipet to cover entire surface. AASC pH was neutralized (by volatile ammonia effect) by placing the microtitre plate inside the 150 mm dish for 24 hours, and observed before removed then dishes from chamber. Finally, the dishes were washed twice by PBS to eliminate the ammonium hydroxide.

Physico-chemical Proprieties of AASC

The physico-chemical characterization was effectuated for the AASC derived from the alternatives origins used for this research.

pH Calibration and Measurement Procedure

The pH meter [wtw pH-Meter pH 522] was adjusted by The two-point calibration at two different pH values. The second calibration point is selected on the basis of the type of solution (acidic in this case pH<7) to be measured. When measuring acidic solutions, acidic and neutral buffers were used (pH = 4.00 and pH=7 solution are common). pH was measured for different concentrations of acetic acid (0.1, 2.9 or 10) and at different degrees of temperature (8, 20 or 37).

Electrical Conductivity and Resistance

In this study, the electric conductivity values of the solubilized collagen were measured by a microprocessor conductivity meter [HydrocureME2673] for different concentrations of acetic acid (0.1, 2.9 or 10), at different degrees of temperature (8, 20 or 37), and with 3 centrifugation speeds (3000, 4000 or 5000 rpm). The electrical resistance was calculated by Amperemeter [Suns YX-2000A] from conductivity values.

Viscosity

A falling ball type viscometer - containing 25 ml of solubilized collagen prepared from different concentrations of acetic acid (0.1, 2.9, or 10) using rat-tails and Sole fish skin- was immersed in a water bath at 4 to 50°C. The viscosity of the AASC was measured for each temperature after 10 minutes of incubation. The fractional change was calculated using the relation [13] :

$$\text{Relative viscosity} = \text{flow time of sample solution} / \text{flow time of acetic acid}$$

The temperature of denaturation was determined by causing a 50% decrease in viscosity. Each point is the mean of triplicate determinations.

RESULTS AND DISCUSSION

The Sole fish skin was obtained from Moroccan Sole fish by a simplified method adapted from Hema method [14]. According to Prabjeet *et al.* [15], the fish skin contain high amount of collagen, this is the reason for chosen as alternative source in the present study. As well as for rat tails, collagen was extracted by an adapted way using a modified method of which used by Huang *et al.* [16] and Rajan *et al.* [12] methods. Non-collagenous tissues were removed before the solubilization by acetic acid in designed system capable to keep temperature in 4 to 20°C interval and maintain agitation speed. The aim of this step is to solublize the fibril collagen into tropocollagen.

For the centrifugation step, usually, to extract collagen we use an ultra-quick refrigerated centrifugation, but in this current study, we modified these methods and make an easier, simplified and optimizing collagen extraction for scientific research and biomedical uses. We analyze the impact of temperature and the centrifugation speed.

Histological Observation

Before obtained AASC from our animal sources, a histological observation was done. The Masson's stain colors collagen green and muscle red. This specific staining is a very valuable tool in determining the source of a number of pathologies. The Sole fish skin was stained by the Masson's stain. The results show that: in microscopic observation, clear red color for muscles but not very visible collagen (Figure 2). The same coloration was used for the Rat-tails and we obtained these results: clear red color for muscles and around them, green color for collagen fibers in (Figures 3 and 4). For the best results, we directly stained by Masson's coloration the tendon and the result showed a green zone wrapping around the rat-tail tendons keeping always the red color for a muscle.

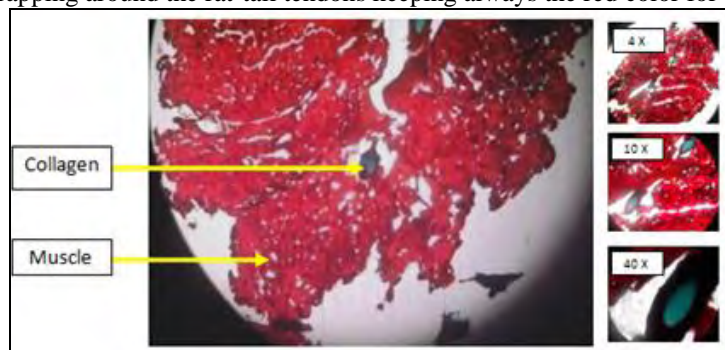


Figure 2: Histological observation of the Sole fish skin spreading (4X)

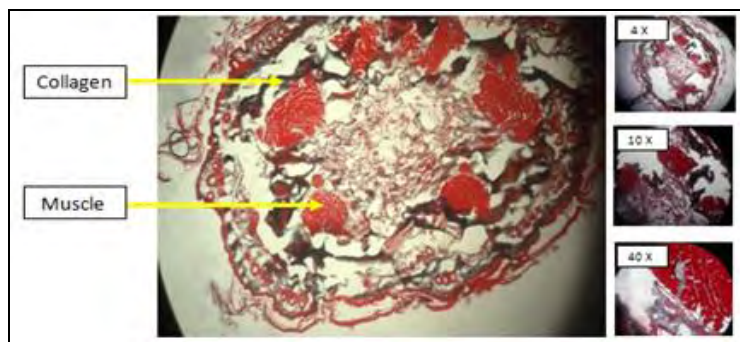


Figure 3: Rat-tails transversal histological observation (4X)

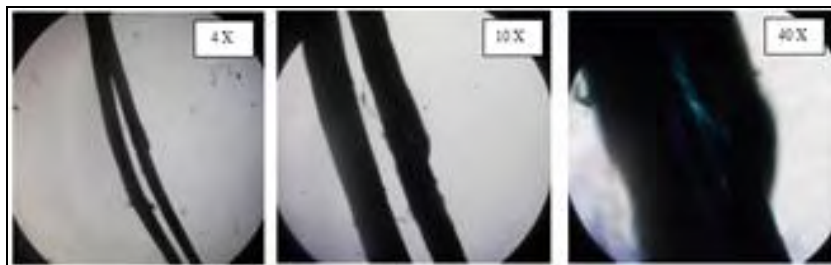


Figure 4: Spreading of rat tails tendons in different magnifications (4X, 10X and 40X)

The Insufficiency of visible green color in the histological observations of tendon and skin (especially for the s/Sole fish skin is probably due to the collagen dissolution, but the collagen traces remarked prove, at least, that collagen exist with more density in Rat-tails that in Sole fish skin. Therefore, the expected result was not very clear.

Collagen Extraction and Yield Measurement

All experiments were conducted in accordance with the Moroccan National Law (License XX-XX). All efforts were made to minimize the number of animals used and their suffering, and the study met the ethical standards used to extract collagen. The result for collagen yield measurement showed a difference between the rat-tails and the Sole fish skin yields. In addition, it was observed that mature female rats present the best yield relatively to male and non-mature rats. The final yield of extracted collagen was calculated and resumed in the following tables (Tables 1 and 2).

Table 1: Yields of sole fish skin AASC

Acetic acid Concentration	Centrifugation speed	Yields
0.10%	3000 rpm	0.175 (±0.046)
	4000 rpm	0.175 (±0.046)
	5000 rpm	0.175 (±0.046)
2.90%	3000 rpm	0.15 (±0.053)
	4000 rpm	0.15 (±0.053)
	5000 rpm	0.137 (±0.051)
10%	3000 rpm	0.112 (±0.035)
	4000 rpm	0.1 (±0.053)
	5000 rpm	0.075 (±0.046)

Table 2: Wistar tails AASC yields

Acetic acid Concentration	Centrifugation speed	Age		
		Less than 20 days	More than 20 days	
			Male	Female
0.10%	3000 rpm	0.312 (0.035)	0.362 (0.051)	0.387 (0.035)
	4000 rpm	0.287 (0.035)	0.337 (0.051)	0.375 (0.046)
	5000 rpm	0.312 (0.035)	0.337 (0.051)	0.35 (0.053)
2.90%	3000 rpm	0.25 (0.053)	0.25 (0.053)	0.287 (0.035)
	4000 rpm	0.187 (0.035)	0.187 (0.035)	0.187 (0.035)
	5000 rpm	0.125 (0.046)	0.25 (0.053)	0.175 (0.046)
10%	3000 rpm	0.087 (0.035)	0.125 (0.046)	0.175 (0.046)
	4000 rpm	0.087 (0.035)	0.125 (0.046)	0.175 (0.046)
	5000 rpm	0.087 (0.035)	0.087 (0.035)	0.125 (0.046)

For AASC solubilized with 0.1% and 3000 rpm, the concentration average of the result solution, was 3 mg/ml (from >20 days female Wistar) and 1.5 mg/ml (from *Sole solea*), but when it was raised to more than these conditions, improvement in the yield of AASC was no longer significant, especially for cell culture applications. After solubilizing collagen and centrifuging. The yields measurement equation, defined the best yields from Sole fish skin and Rat-tails respectively 17.5 and 38.7%. The concentration of acetic acid (and therefore its pH) influences clearly the extraction yields of the protein (solvent effect denaturation thereafter affect the solubility) (Figure 5).

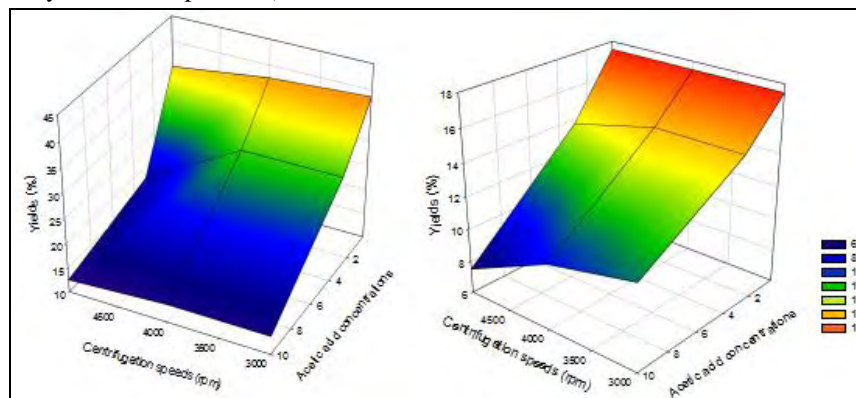


Figure 5: Response surface plot showing the effects of acetic acid concentration and centrifugation speed on the yield of AASC of Rat-tails (left) and Sole fish skin (right). The extraction temperature interval was constant at 4 to 20°C

More precision needs using more measurement tools and protocol optimizations. There are many ways to extract proteins and especially for collagen extraction, 3 major methods known: pepsin-solubilized collagen, salt-solubilized collagen, acid solubilized collagen [17]. In this study, only one method was used: acid-solubilized collagen method with the acetic acid. Therefore, an extraction of collagen using one of the other different methods or all the three methods comparing their results may give more positive findings, and it should be especially recommended using acid pepsin method which showed, in others scientific previous studies, a higher yield result of collagen from various collagen sources [18]. Using standard double layers filter papers in this study for collagen solution might allow a favored passage to collagen through its pore, and quantitative loss. In the future, a specific membrane should be used. For example, using a spectra/pormwco 12-14,000RC membrane, which is very specific for Collagen type I [19]. This membrane is specific for collagen type I. Other methods for collagen extraction must be used to identify and check the purification of AASC, such as high-performance thin-layer chromatography (HPTLC), Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel electrophoresis (SDS-PAGE) and/or modified Lowry's method [20].

Checking AASC Type I Efficiency

As we could not have a positive result for Hydroxyproline test, we tried to check AASC efficiency by gel formation using two methods: basic solution and ammonia method. The aim of these two ways was to neutralize the pH of AASC and induce the matrices formation.

Collagen Matrices Formation by a Basic Solution

A cloudy visual result was observed in the incubated dishes, and it was examined under a phase microscopy. The observations were resumed as following: (Tables 3 and 4) (Figures 6-13).

The combination of the results above determines the AASC extracted Wistar Rat-tails as best source of gel formation in the optimal found conditions (37°C and neutral pH). Acetic acid concentration and centrifugation speeds influence the gel formation. It's also noted that the female Wistar give the better result than male.

The black points seen on the observation, under contrast phase microscopy, are normally fibrils extending perpendicularly of the used wells surface. The best result expected for AASC of the Rat-tails are 0.1% Acetic acid concentration and centrifuged at 3000 rpm comparatively to the other used solution for ammonia collagen gelation.

From the observed result we could conclude that the collagen can polymerize at about pH 6.0 to 8.0 but the polymerization efficiency of collagen to gels at lower pH are weaker. In result of basic solution gel formation method: The temperature was also an influent factor of polymerization. The Incubated collagen at high temperatures (37°C) results more polymerized gels than at lower temperature (4°C) weaker and with thicker fibers. The use of more 10X DPBS results larger polymerized gels and leaving plates uncovered in laminar flow hood gives quick results but with a risk to dry if leaved for long duration.

Table 3: Visual estimation of gel formation

			Wistar rats						Sole fish	
			> 20 days				< 20 days			
			Male		Female		4	37	4	37
% ac	Cen.sp	pH/T°	4	37	4	37	4	37	4	37
0.1	3000	6	++	++	+++	+++	-	-		
		8	++	++	+++	++++	+	+		
	4000	6	+	+	++	+++	-	-		
		8	+	++	++	+++	-	-		
	5000	6	+	+	+	++	-	-		
		8	+	+	++	++	-	-		
0.5	3000	6	+	+	+	++	-	-		
		8	+	+	+	++	-	-		
	4000	6	-	-	+	++	-	-		
		8	-	+	+	++	-	-		
	5000	6	-	-	+	+	-	-		
		8	-	+	-	+	-	-		
10	3000	6	-	-	-	-	-	-		
		8	-	-	-	-	-	-		
	4000	6	-	-	-	-	-	-		
		8	-	-	-	-	-	-		
	5000	6	-	-	-	-	-	-		
		8	-	-	-	-	-	-		

++++: Very good gel formation; +++: Good gel formation; ++: Weak gel formation; +: Very weak gel formation; -: No gel formation

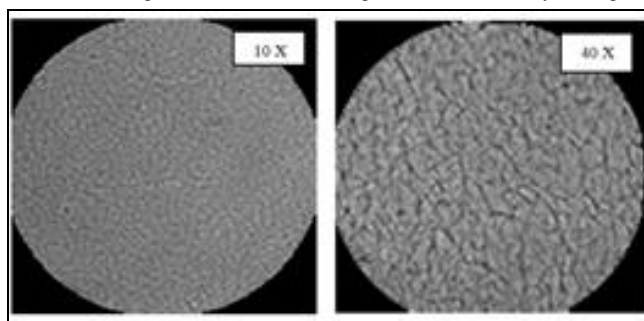
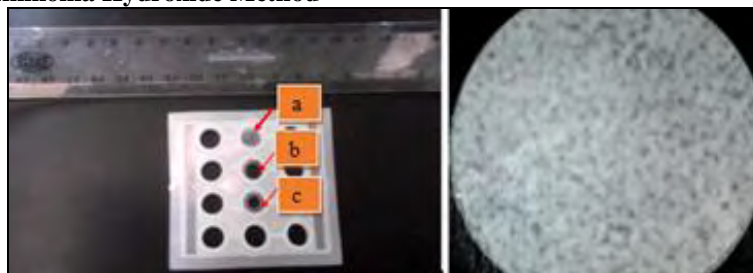


Figure 6: Phase microscopic observation of the formed collagen fibrils

Collagen Gelation: Ammonia Hydroxide Method



(a: Good gel formation, b: very weak gel formation, c: weak gel formation)

Figure 7: Visual and phase microscopic (10x) result of Ammonia method

It was noted, from the obtained results, that the gelation is more observed in Rat-tails extracted collagen, and that it's increases with the increase of incubation temperature, and with the decrease for both: the centrifugation speed and the acetic acid concentration. The same results were partly noted in Ammonia method: The combination of the results above determines the AASC extracted Wistar Rat-tails as best source of gel formation in the optimal founded conditions (37°C and neutral pH). It's also noted that the female Wistar give better result than the male and that acetic acid concentration and centrifugation speeds influence this gel formation. The two methods prove a remarkable efficiency of AASC extracted from the two sources, and the use of the second method (ammonia method) was done to avoid any effect of the AASC contact with neutralizing solution because of the ammonia nature as neutralizing volatile chemical product.

Table 4: Visual estimation of collagen gel formation

		Wistar rats			Sole fish
		> 20 days		< 20 days	
		Male	Female		
0.1	3000	+++	+++	++	++
	4000	++	+++	+	++
	5000	++	++	+	+
0.5	3000	++	+++	+	-
	4000	++	++	+	+
	5000	++	++	+	-
10	3000	-	+	-	-
	4000	-	-	-	-
	5000	-	-	-	-

+++ : Good gel formation; ++ : Weak gel formation; + : Very weak gel formation; - : No gel formation

Physico-chemical Proprieties of AASC

After checking AASC efficiency, its physico-chemical characterization was done and the results prove that the extracted AASC can be used in scientific and biomedical research applications.

pH Measurement

The acetic acid concentration of and the temperature changes were determinants controller factor of solubilized collagen pH.

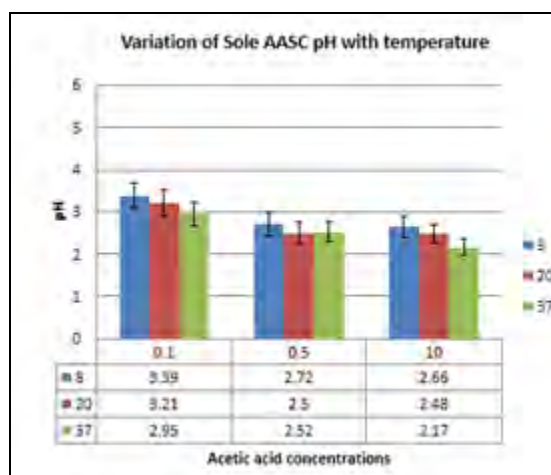


Figure 8: Presentations of the acid concentrations (M) and temperature influence on AASC extracted from sole fish skin

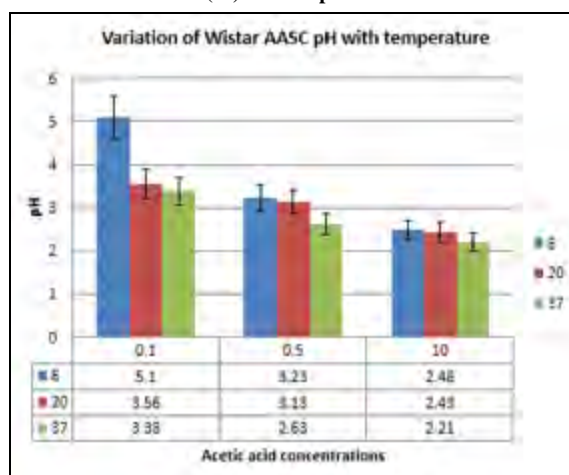


Figure 9: Presentations of the acid concentrations (M) and temperature influence on AASC extracted from Wistar Rat-tails

The influence of acid concentration and the temperature on the collagen extracted was noted, and the influence of centrifugation speed was not measured to eliminate confusions (large standard deviation values were noted), we need sophisticated materials for observation.

The pH of AASC of the two sources was acid due to the use of acetic acid for solubilization, and the best yields correspond respectively to the highest pH values. These pH values are more acid in the case of AASC extracted from Sole fish skin. In addition, and due to the low precision of the used pH meter and the large standard deviations in the results, the influence of centrifugation speed on the AASC pH wasn't measured. This pH variation study demonstrate that the collagen extraction should be done by solution of acetic acid diluted with a relatively high pH (>3) to avoid the collagen denaturation. But, comparatively to the pH of commercial solution of collagen type I (3 to 5), the results were tolerable.

Electrical Conductivity and Resistance

The conductivity of the AASC extracted from the Sole fish skin and Wistar rat-tails was influenced clearly by temperature, acid concentration and slightly by centrifugation speed. The lowest values of conductivity are observed in low values of variable conditions (except centrifugation speed). The results of the electrical conductivity showed expected results that we can discussed as following: the nature of ions and the viscosity of liquids influence the conduction phenomenon. In aqueous solutions the conduction is due to ionic movement and the behavior is totally different from metals. In the human tissues the specific conductivity is variable according to the nature of each tissue [21-24].

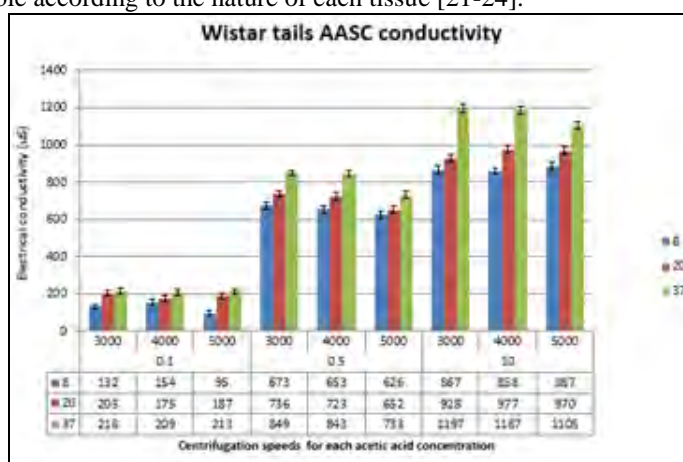


Figure 10: Presentation of the influence of centrifugation speed (rpm), the temperature (°C), and acid concentration (M) on the Wistar (female) rat-tails AASC electrical conductivity (uS)

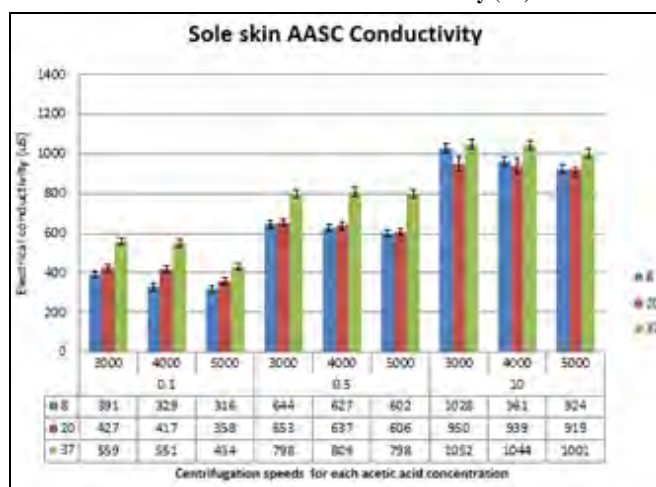


Figure 11: Presentation of the influence of centrifugation speed (rpm), the temperature (°C), and acid concentration (M) on the sole fish skin AASC electrical conductivity (uS)

The theoretical electric resistance values correspond closely to the values found by experimental verification (with an average standard deviation equals to 7 μS). The values of electrical resistance are inversely proportional to those of conductivity. Therefore, the collagen whose yield is highest matches to an electrical semi-conductor or bad conductor. Tomaselli [25] have been proved that the collagen acts as a semiconductor whose direct current conductivity increases exponentially with hydration. They show that everything happens as if, in the context of a semi-electronic conduction, the water was acting a "donor" of charge. This effect of water is reversible and does not involve any chemical alteration of the

collagen. And as known in regenerative medicine, nerves and skeletal muscles respond and communicate via electrical signals; because of this fact, there is recent emphasis on using conductive biomaterials to improve electrical conduction through tissue-engineered scaffolds, and as consequence increase cell differentiation and tissue regeneration.

As expected, the conductivity of the used animal sources rises with the temperature increase, which is similar of what happens in graphite but opposite to what happens in metals. Therefore, it's clearly observed that the electric conductivity of collagen depends on the temperature and increase exponentially with the augmentation of the used acetic acidity concentration. Moreover, the AASC whose yield is higher corresponds generally to low electrical conductivity (high electrical resistance) and vice-versa. That means that we will control cell responses in three-dimensional conductive collagen gel scaffolds, but also produce collagen scaffolds compatible to every tissue regarding its own specific conductivity. The influence of centrifugation speed was opposite to expected. As known, the molecular weight distribution of collagen could be changed by centrifugation. The results obtained can be understood as a possible mechanical degradation of collagen in small scale and in specific conditions of centrifugation favored by the acetic acid concentration which decreases the proportion of population with high molecular weight in favor of those of oligomers and small molecules. But due probably to the hypothesis that a high speed centrifugation for a long time can induce an agglomeration of these oligomers and make conductivity lower. This destruction mechanism depends on the acetic acid concentration because the protonation degree controls the conformation of macromolecules, but also the centrifugation speed which influences probably this molecular distribution and then the collagen conductivity and its energy activation point.

Viscosity

The denaturation temperature (T_d) of Sole fish skin and Wistar Rat-tails collagen sample was calculated from the thermal denaturation curves and the T_d of the collagen was noted as the temperature at which the fractional viscosity value was 0.5.

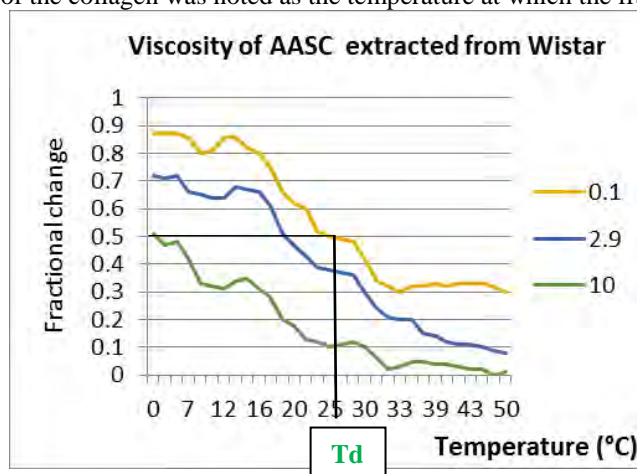


Figure 12: Thermal denaturation curves of Wistar (female) rat-tails collagen solution as measured by viscosity in 0.1, 2.9 and 10% of acetic acid

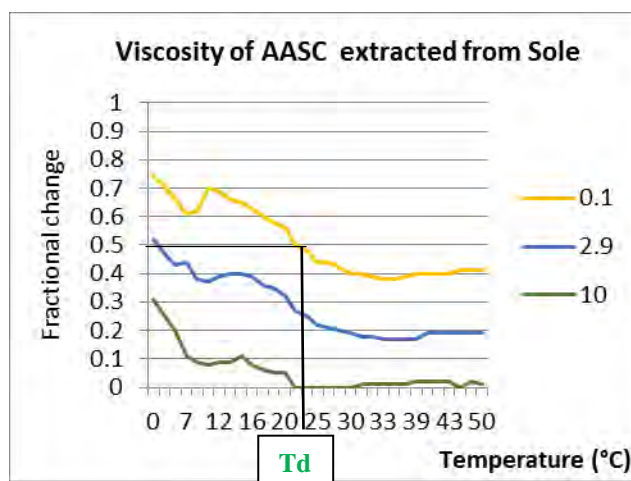


Figure 13: Thermal denaturation curves of sole fish skin collagen solution as measured by viscosity in 0.1, 2.9 and 10% of acetic acid

The result curves illustrate the inverse proportional variation of the AASC (extracted from Sole fish skin and Wistar Rat-tails) viscosity according to the temperature changes and acetic acid concentration. These results signify that the AASC whose the yield is higher, have consequently, a higher denaturation temperature, and it is more viscous.

The viscosity characterization results demonstrated that the best Td of the AASC from Wistar Rat-tails was about 26°C, but the Td of AASC from Sole fish skin was only about 22°C, which was mainly because of the hydrolysis action of enzyme. The Td of the AASC of Sole fish skin, was lower than of Wistar Rat-tails which also was lower or higher than the Td of many other sources of collagen measured under, approximately, the same conditions [26,27]. The earlier studies showed that the stability of collagen is correlated to environmental and body temperatures [28]. And this present studies reported that Hydroxyproline is important in maintaining the stability of trimmers in collagen.

CONCLUSION

This study confirmed that Wistar rat-tails and *Sole solea* fish skin are respectively alternative sources of collagen type I which can be used as natural biocompatible and biodegradable material (scaffolds), especially in 3D cell culture for biomedical applications and research uses. The optimal parameters to produce collagen from both alternatives were: 0.1% of acetic acid concentration; 3000 rpm centrifugation speed and 3 days of extraction time of solubilization in a temperature interval of 4 to 20°C.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by the Faculty of medicine and pharmacy Authors thank Mr Mohammed FELLAHI of Histology – Embryology & Cytogenetics Laboratory (Mohammed V University, Faculty of Medecine and Pharmacy, Rabat, Morocco) for his help and availability during the research and analysis steps.

REFERENCES

- [1] S Yamada; K Yamamoto; T Ikeda; K Yanagiguchi; Y Hayashi. *BioMed Res Int.* **2014**, 2014, 8.
- [2] C Meena; S Mengi; SG Deshpandy. *Proc Indian Acad Sci.* **1999**, 111, 319-329.
- [3] H Yuna; JR Ahn; JW Woo; CK Jung; SM Cho; YB Lee; SB Kim. *Fisheries Aquat Sci.* **2010**, 13, 102-111.
- [4] B Gimenez; J Turnay; MA Lizarbe; P Montero; MC Gomez-Guillen. *Food Hydrocolloid.* **2005**, 19, 941-950.
- [5] M Sadowska; I Kolodziejska; C Niecikowska. *Food Chem.* **2003**, 81, 257-262.
- [6] JW Woo; SJ Yu; SM Cho; YB Lee; SB Kim. *Food Hydrocolloid.* **2008**, 22, 879-887.
- [7] P Singh; S Benjakul; S Maqsood; H Kishimura. *Food Chem.* **2011**, 124, 97-105.
- [8] LS Senaratne; PJ Park; SK Kim. *Bioresource Technol.* **2006**, 97, 191-197.
- [9] JH Muyonga; CGB Cole; KG Duodu. *Food Chem.* **2004**, 85, 81-89.
- [10] P Kittiphattanabawon; S Benjakul; W Visessanguan; T Nagai; M Tanaka. *Food Chem.* **2005**, 89, 363-372.
- [11] JH Wang; S Mizuta; Y Yokoyama; R Yoshinaka. *Food Chem.* **2007**, 100, 921-925.
- [12] N Rajan; J Habermehl; M Coté; CJ Doillon; D Mantovani. *Nat Protocols.* **2007**, 1, 2753-2758
- [13] S Kimura; X Zhu; R Matsui; M Shijoh; S Takamizawa. *J Food Sci.* **1988**, 23, 1315-1316.
- [14] GS Hema; K Shyni; M Suseela; R Anandan; G Ninan; PT Lakshmanan. *Ann Bio Res.* **2013**, 4, 271-278.
- [15] S Prabjeet; B Soottawat; M Sajid; K Hideki. *Food Chem.* **2011**, 1, 97-105.
- [16] YC Huang; TW Wang; JS Sun; FH Lin. *J Biomed Sci.* **2005**, 12, 855-67.
- [17] AG Ward, A Courts. *The science and technology of gelatin*, Academic Press, London ; New York, **1977**, xvi, 564.
- [18] E Skierka; M Sadowska. *Food Chem.* **2007**, 105, 1302-1306.
- [19] S Cliché; J Amiot; C Avezard; C Gariépy. *Science.* **2003**, 82, 503-509
- [20] MA Markwell; SM Haas; LL Bieber; NE Tolbert. *Anal Biochem.* **1978**, 87, 206-210.
- [21] LA Geddes; LE Baker. *Med Biol Eng.* **1967**, 5, 271-293.
- [22] BR Epstein; KR Foster. *Med Biol Eng Comput.* **1983**, 21, 51-55.
- [23] S Rush; JA Abildskov; McFeer. *Circ Res.* **1963**, 12, 40-50.
- [24] HP Schwan; CF Kay. *Ann NY Acad Sci.* **1957**, 65, 1007-13.
- [25] VP Tomaselli. *Biopolymers.* **1974**, 13, 2423-2434.
- [26] T Nagai; W Worawattanamateekul; N Suzuki; T Nakamura; T Ito; K Fujiki; M Nakao; T Yano. *Food Chem.* **2000**, 70, 205-208.
- [27] T Nagai; Y Araki; N Suzuki. *Food Chem.* **2002**, 78, 137-177.
- [28] BJ Rigby. *Nature.* **1968**, 219, 166-167.

Références bibliographiques

1. WHO fact sheet on traditional medicine. WHO (2008)
2. Coxam V. Ostéoporose et prévention nutritionnelle. EMC (Elsevier Masson SAS, Paris), Endocrinologie-Nutrition, 10-308-A-55, 2010.
3. Kaddafi A., Daoudy K., Marmouzi I. and al. In vitro antioxidant and anti-inflammatory activities of extracts of pearl millet *Pennisetum glaucum* L. *Jcpr* 2015, 7(6), 1-6
4. Brown J.P., Morin S., Leslie W. and all, Les bisphosphonates dans le traitement de l'ostéoporose. *Can Fam Physician* 2014 Apr; 60(4): 197-207.
5. Thomas T., Martin A. , Lafage-Proust M.H. . Physiologie du tissu osseux.EMC (Elsevier Masson SAS). Appareil locomoteur. 2008 14-002-B-10.
6. Berendsen A.D., Olsen B.R. Bone development. *Bone* 2015; 80 14–18
7. Kierszenbaum A.L, *Histology and cell biology an introduction to pathology*, Mosby 2002 New York
8. Spas-Defasque E., Renaud A., Cortet B., Herbinet P., Boutry N., Cotten A. *Ostéopathie Imagerie musculosquelettique - Pathologies générales*. 2^e édition 2013. Elsevier. Masson Paris
9. Maes C., Kronenberg H.M. Bone Development and Remodeling [Endocrinology: Adult and Pediatric](#), Chapter 60, 1038-1062. In *endocrinology adult and pediatric*. Jameson J.L. and De Groot L.J. 7 edition. Elsevier. US
10. André J.M., Catala M., Morère J.J., et al. *Histologie : les tissus Service d'Histologie – Embryologie, Site Pitié- Salpêtrière*.
<http://www.chups.jussieu.fr/polys/histo/histoP1/POLY.Chp.5.2.html>. 09/05/2017
11. Blair H.C., Teitelbaum S.L., Ghiselli R., et al. Osteoclastic bone resorption by a polarized vacuolar proton pump. *Science* 1989 ; 245 : 855–7.
12. Mullender M.G., Huiskes R. Osteocytes and bone lining cells: which are the best candidates for mechano-sensors in cancellous bone ? *Bone* 1997; 20: 527–32.

13. Poole K.E., van Bezooijen R.L., Loveridge N., et al. Sclerostin is a delayed secreted product of osteocytes that inhibits bone formation. *FASEB J* 2005; 19: 1842–4.
14. Enomoto H., Enomoto-Iwamoto M., Iwamoto M., et al. *Cbfa1* is a positive regulatory factor in chondrocyte maturation. *J Biol Chem* 2000; 275: 8695–702.
15. O'Brien EA, Williams JH, Marshall MJ. Osteoprotegerin ligand regulates osteoclast adherence to the bone surface in mouse calvaria. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 274 : 281–90
16. Krishnan V, Bryant HU, Macdougald OA. Regulation of bone mass by Wnt signaling. *J Clin Invest* 2006 ; 116 : 1202–9
17. Funk T., Orcel P. ostéoporose EMC (Elsevier Masson) Traité de médecine Akos 7-0630 , 2010
18. Delmas P.D. Biochemical markers of bone turnover in Paget's disease of bone. *J Bone Miner Res* 1999 14(Suppl.2) : 66–9.
19. Boivin GY, Chavassieux PM, Santora AC, et al. Alendronate increases bone strength by increasing the mean degree of mineralization of bone tissue in osteoporotic women. *Bone* 2000 ; 27 : 687–94.
20. Lafage-Proust M.-H. Physiopathologie de l'ostéoporose mt, vol. 10, n° 6, novembre-décembre 2004
21. Suda T, Ueno Y, Fujii K, et al. Vitamin D and bone. *J Cell Biochem* 2003; 88: 259–66.
22. Balemans W, Ebeling M, Patel N, et al. Increased bone density in sclerosteosis is due to the deficiency of a novel secreted protein (SOST). *Hum Mol Genet* 2001 ; 10 : 537–43.
23. Lacey D.L, Tan H.L., Lu J, et al. Osteoprotegerin ligand modulates murine osteoclast survival in vitro and in vivo. *Am J Pathol* 2000 ; 157 : 435–48.

24. Mizuno A., Kanno T., Hoshi M., et al. Transgenic mice overexpressing soluble osteoclast differentiation factor (sODF) exhibit severe osteoporosis. *J Bone Miner Metab* 2002; 20: 337–44.
25. Fujita T, Fukuyama R., Izumo N, Hirai T. [Transactivation of core binding factor \$\alpha\$ 1 as a basic mechanism to trigger parathyroid hormone-induced osteogenesis](#). *Jpn J Pharmacol* 2001; 86 : 405–16
26. Glass 2nd D.A., Bialek P., Ahn J.D., et al. Canonical Wnt signaling in differentiated osteoblasts controls osteoclast differentiation. *Dev Cell* 2005; 8 : 751–64.
27. Aicher A., Kollet O., Heeschen C., et al. The Wnt antagonist Dickkopf-1 mobilizes vasculogenic progenitor cells via activation of the bone marrow endosteal stem cell niche. *Circ Res* 2008 ; 103 : 796–803.
28. Ikeda T., Utsuyama M., Hirokawa K. Expression profiles of receptor activator of nuclear messenger RNA in aged and ovariectomized rat bones. *J Bone Miner Res* 2001; 16: 1416–25.
29. Whitfield J.F., Morley P., Willick G.E.. Parathyroid hormone, its fragments and their analogs for the treatment of osteoporosis. *Treat Endocrinol* 2002; 1: 175–90.
30. Noel Sturm University of Arizona, College of Medicine <http://chemistry.gravitywaves.com> 16/03/2017
31. Manolagas S.C.. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev* 2000 ; 21 : 115– 37.
32. Allet E. Vitamine D. EMC Elsevier Masson SAS France, Pédiatrie, 4-002-G-10, 2010
33. Takeda S., Eleftheriou F., Levasseur R., *et al.* Leptin regulates bone formation via the Sympathetic nervous system. *Cell* 2002; 111(3): 305-17.
34. Blain H. La fragilité osseuse dans la fragilité du sujet âgé *Annals of Endocrinology (Annales D'Endocrinologie, English Edition)*, 2013, Volume 74, Numéro 4, Pages 246-249
35. World Health Organisation 1994 Assessment of fracture risk and its application to

- screening for postmenopausal osteoporosis. Technical Report Series. WHO, Geneva
36. D Delalande, C. Jung, I. Labedan, P. Lechevalier, C. Madre, S. Roche, I. Kone Paut
Juvenile osteoporosis. *Archives de Pédiatrie* 2008;15:420-430
37. Cooper C., Campion G., Melton L.J. Hip fractures in the elderly: a world-wide projection. *Osteoporosis Int.* 1992 Nov;2(6):285-9.
38. El Maghraoui A, Ghazi M., Gassim S., et al. Bone mineral density of the spine and femur in a group of healthy Moroccan men. *Bone* 2009; 44: 965-9.
39. Rapport de la Communauté européenne. – Building strongbones and preventing fractures. Summary report on osteoporosis in the European Community - Action for prevention. Lavoisier France, Bruxelles, 1999, 1-123.
40. Das U. Nitric oxide as the mediator of the antiosteoporotic actions of estrogen, statins, and essential fatty acids. *Exp. Biol. Med.* 2002, 227, 88-93.
41. Deguchi K., Kamada M., Irahara M. *et al.* – Postmenopausal changes in production of tye 1 and 2 cytokines and the effects of hormone replacement therapy. *Menopause*, 2001, 8, 266-273.
42. Rho J., Takami M., Choi Y. – Osteoimmunology : interactions of the immune and skeletal systems. *Mol. Cell.*, 2004,17, 1-9.
43. Mody N., Parhami F., Sarafian T.A., Demer L. – Oxidative stress modulates osteoblastic differentiation of vascular and bone cells. *Free Rad. Biol. Med.*, 2001, 31, 509-519.
44. Lips P. Vitamin D, deficiency and secondary hyperparathyroidism in the elderly : consequences for bone loss and fractures and therapeutic implications. *Endocr Rev* 2001 ; 22 : 477–501.
45. Funck-Brentano T., Orcel P. Ostéoporose. EMC (Elsevier Masson SAS France), AKOS (Traité de Médecine), 7.2010,
46. Fitzpatrick L.A. Secondary causes of osteoporosis. *Mayo Clin Proc* 2002 ; 77 : 453–68.

47. Remer T. Influence of nutrition on acid-base balance metabolic aspects. *Eur. J. Nutr.*, 2001, 40
48. Debiais F. Genetics and bonemetabolism *Revue du rhumatisme monographies* 77 (2010) 307–313
49. Michou L., Brown J.P. Genetics of bonediseases *Revue du rhumatisme monographies* 77 (2010) 314– 320
50. Cabanne.F., Bonenfant J.L. Anatomie pathologique La presse de l’université Laval Maloine 1980 384, 525.
51. Couris C.M., Chapurlat R.D., Kanis J.A., et al. FRAX® probabilities and risk of major osteoporotic fracture in France. *Osteoporos Int* 2012 ; 23 : 2321–7.
52. Rauch F., Glorieux F.H. Osteogenesis imperfecta. *Lancet* 2004;363:1377–85.
53. Clavert J.M., Gicquel P, Giacomelli M.C. Ostéogénèse imparfaite ou enfant maltraité. *Arch Pediatr* 2006; 13:730–3.
54. Kanis J.A., McCloskey E.V., Johansson H., Strom O., Borgstrom F., Oden A., et al. Case finding for the management of osteoporosis with FRAX – assessment and intervention thresholds for the UK. *Osteoporos Int*2008; 19:1395–408.
- 55 McKenzie R., Reynolds J.C., O’Fallon A., Dale J., Deloria M., Blackwelder W., et al. Decreased bone mineral density during low dose glucocorticoid administration in a randomized, placebo controlled trial. *J Rheumatol* 2000;27: 2222–6.
56. Briot K., Roux C. Corticosteroid-induced osteoporosis. *La Revue de médecine interne* 2013; 34 315–323.
57. De Laet C., Kanis J.A., Oden A, et al. Body mass index as a predictor of fracture risk: a meta-analysis. *Osteoporos Int* 2005; 16:1330–8.
58. Johansson H., Kanis J.A., Oden A., et al. A meta-analysis of the association of fracture risk and body mass index in women. *J Bone Miner Res* 2015; 29:223–33.
59. Cortet B., Roux C. Ostéoporose obesity and osteoporosis. *Revue du rhumatisme monographies* 2016 ; 83 : 25–28

- 60 Audran M., Briot K. Critical reappraisal of vitamin D deficiency. *Joint Bone Spine* 2010;**77**:115–9.
61. Guggenbuhl P., Chalès G. Os et foie Revue du rhumatisme monographies 2013 ; 80 : 88–93
62. Javier R.M., Kuntz J.L. “Osteoporosis” treatment in patients with chronic renal failure, dialysis or renal transplantation La Lettre du Rhumatologue - n° 334 - septembre 2007
63. Lafage-Proust M.H. Physiopathologie de l’atteinte osseuse au cours de l’insuffisance rénale chronique réalités en rhumatologie # 48_Octobre 2012
64. Atsumi K., Kushida K., Yamazaki K. et al. Risk factors for vertebral fractures in renal osteodystrophy. *Am J Kidney Dis* 1999; 33: 287-93.
65. Alem A.M., Sherrard D.J., Gillen D.L. et al. Increased risk of hip fracture among patients with end-stage renal disease. *Kidney Int* 2000;58:396-9.
66. Ribot C, Tremollieres F. Mise au point - place du traitement hormonal substitutif dans la prise en charge de l’ostéoporose post-ménopausique et la prévention du risque fracturaire. *Presse Med* 2006; **35**: 1557-63.
67. Kalkwarf H.J., Khoury J.C., Lanphear B.P.. Milk intake during childhood and adolescence, adult bone density, and osteoporotic fractures in US women. *Am J Clin Nutr* 2003; **77**: 257-65.
68. Morabito N., Crisafulli A., Vergara C., Gaudio A., Lasco A., Frisina N., et al. Effects of genistein and hormone-replacement therapy on bone loss in early postmenopausal women: a randomized double-blind placebo-controlled study. *J Bone Miner Res* 2002;**17**:1904-12.
69. Marini H., Minutoli L., Polito F., Bitto A., Altavilla D., Atteritano M., et al. OPG and sRANKL serum concentrations in osteopenic, postmenopausal women after 2-year genistein administration. *J Bone Miner Res* 2008;**23**:715-20.
70. Das U. Nitric oxide as the mediator of the antiosteoporotic actions of estrogen, statins, and essential fatty acids. *Exp Biol Med* 2002;**227**: 88-93.

71. Horcajada-Molteni M.N., Coxam V. Flavonols and isoflavones prevent bone loss in the ovariectomized rat, a model for postmenopausal osteoporosis. In: Burkhardt F, editor. *Nutritional aspect osteoporosis*. New York: Academic Press; 2001. p. 325-40
72. Arjmandi B.H., Khalil D.A., Lucas E.A., Georgis A., Stoecker B.J., Hardin C., et al. Dried plums improve indices of bone formation in postmenopausal women. *J Womens Health Gen Based Med* 2002; **11**: 61-8.
73. Hegarty V.M., May HM, Khaw KT. Tea drinking and bone mineral density in older women. *Am J Clin Nutr* 2000; **71**:1003-7.
74. Briot K. , Roux C. Post-menopausal osteoporosis: Up-to-date *La Revue de médecine interne* 2016; **37**: 195–200
75. Neer R.M., Arnaud C.D., Zanchetta J.R., Prince R., Gaich G.A., Reginster J.Y., et al. Effect of parathyroid hormone (1-34) on fractures and bone mineral density in postmenopausal women with osteoporosis. *N Engl J Med* 2001; **344**:1434–41.
76. McClung M., Langdahl B., Papapoulos S., Saag K., Adami S., Bone H., et al. Fracture efficacy and safety in postmenopausal women with osteoporosis .Results from the phase III Long-term Odanacatib Fracture Trial (LOFT). *ASBMR*2014;(1147).
77. Lamendin H., Requirand P. "Phytothérapie et aromathérapie buccodentaires." *EMC-Dentisterie* 2004 ; **1**: 179-192.
78. André C., Michel J., Serge H., Dominique N.. *L'amélioration des plantes tropicales*, 1997 Cirad. Orstom 482. France.
79. Latham, M. C. *Céréales, racines amyliacées et autres aliments riches en glucides* 2002. La nutrition dans les pays en développement. FAO 2001, Département de l'agriculture: 505.
80. USDA, "The PLANTS Database, 16 November 2016(<http://plants.usda.gov>)." Data compiled from various sources by Mark W. Skinner. National Plant Data Center, Baton Rouge: 2006 LA 70874-74490 USA.
81. Brunken J.N., de Wet J.M.J.; Harlan J.R. The morphology and domestication of pearl millet. *Econ Bot* 1977; **31**: 163 – 174

82. Rai K.N., Appa Rao S., Reddy K.N.. Pearl millet. In: Fuccillo D, Sears L, Stapleton P, éditeurs. Biodiversity in Trust, Conservation and use of Plant genetic Resources in CGIAR Centers. Cambridge University Press, Cambridge, UK. 1997 pp. 243–258.
83. SYNGENTA. What is pearl millet? 2008: http://www.syngentafoundation.org/what_is_pearl_millet.htm. <http://> 12/10/2016
84. Powers, D.; kanemasu, E.T.; Singh, P. & Kretineir, G. - "Floral development of pearl millet", Field Crops Research, 1980; III: 245-266.
85. ICRISAT, F. e. le mil. L'economie mondiale du sorgho et du mil: faits, tendances et perspectives. D. é. e. social. 1994 ; Rome, Italie, FAO.
86. UPADHYAYA HD, R. K., Sastry DVSSR ; "Directives pour la régénération : mil à chandelles. In: Dulloo M.E., Thormann I., Jorge M.A. and Hanson J., editors. Crop specific regeneration guidelines. CGIAR System-wide Genetic Resource Programme (SGRP)." 2008; Rome, Italy: 10.
87. Dykes L., Rooney L. "Sorghum and millet phenols and antioxidants." J Cereal Sci 2006; **44**: 236-251.
88. Awika J.M., Rooney L. "Sorghum phytochemicals and their potential impact on human health." Phytochemistry 2004; **65**(9): 1199-1221.
89. Adeola O., Orban J. "Chemical Composition and Nutrient Digestibility of Pearl Millet (*Pennisetum glaucum*) Fed to Growing Pigs." J Cereal Sci 1995; **22**: 177-184.
90. Bhatia J.N., Thakur D.P. "Biochemical Components of Pearl Millet (*Pennisetum glaucum* L. R. Br.) Tissues in Healthy and Diseased State Induced by *Sclerospora graminicola* (Sacc.) Schroet." Biochem Physiol Pflanzen 1992; **188**: 349-353.
91. Kaur KD, J. A., Sabikhi L, Singh A.K. ("Significance of coarse cereals in health and nutrition: a review." J Food Sci Technol 2012; **51**(8): 1429-1441.
92. Davis A.J., Dale N.M., Ferreira F.J. "Pearl Millet as an Alternative Feed Ingredient in Broiler Diets." J Appl Poult Res 2003; **12**: 137-144.

93. Nambiar V.S., D. J., Sareen N., Shahu .T, Desai R. "Potential Functional Implications of Pearl millet (*Pennisetum glaucum*) in Health and Disease." J Appli Pharma Sci 2011; **1**(10): 62-67.
94. Rooney L.W. "Sorghum and pearl millet lipids." Cereal Chem 1978; **55**: 584-590.
95. Ben Mustapha M., Bousselmi M., Jerbi T., Ben Bettaieb N., Fattouch S "Gamma radiation effects on microbiological, physic-chemical and antioxidant properties of Tunisian millet (*Pennisetum Glaucum* L.R.Br.)." Food Chem 2014; **154**: 230-237.
96. Chandrasekara A., Shahidi F. "Antiproliferative potential and DNA scission inhibitory activity of phenolics from whole millet grains." J functional foods 2011; **3**: 159-170.
97. Nani A., B. M., Soualem Z., Ghanemi F.Z., Borsali N., Amamou F. "Study of the impact of millet (*Pennisetum glaucum*) on the glucidic metabolism in diabetic rats." Annals of Biological Research 2011 ; **2**(4): 21-23.
98. Nagarathna P.K.M., J. D. "Study on Antithyroid Property of Some Herbal Plants." Int J Pharm Sci Rev Res 2013; **23**(2): 203-211.
99. Willett W., M.. J., Liu S. "Glycemic index, glycemic load, and risk of type 2 diabetes." Am J Clin Nutr 2002; **76**: 274-280.

ملخص :

يهدف عملنا تقييم تأثير الدخن "إبلان L. Pennisutum glaucum" على هشاشة العظام مقارنة مع نوع من البيفوسفونات: الالندرونات (Alendronate (biphosphonate) دواء مضاد للهشاشة.

يتكون هذا العمل من جزئين.

في الجزء الأول قمنا بجرد شامل للأدبيات التي تخص البناء والتكوين العظمي ثم هشاشة العظام وعلاقة الدخن بهشاشة العظام. يظهر هذا الجرد تقدما كبيرا في فهم الآليات الجزيئية الكامنة وراء إعادة تشكيل العظام ومدى تأثير العوامل المحلية مثل نظام WNT، osteoprotegerin، RANK / RANKL ... والهرمونات والدور الذي تلعبه شتى أنواع الخلايا المسؤولة عن تكوين العظام وظواهر ارتشاف العظام. وتمثل الأمراض الأكثر شيوعا في هشاشة العظام ما يحدث بعد سن اليأس من هشاشة في العظام. ويعد التداوي بالكظر (كورتيكوستيرويد) من أخطر الاسباب الكامنة وراء حدوث هذه الهشاشة. تشمل العلاجات الحالية علاوة على الادوية المقوية للعظام والمحضرة كيميائيا، أخرى تركز اساسا على معطيات الطب التقليدي و ما يقدمه من علاجات سهلة وبسيطة ولكنها ناجعة. وقد اصبح هذا الطب يسمى بالعلاج "البديل" واصبح ذا أهمية كبرى .

من المعروف أن للدخن في الطب التقليدي المغربي دور كبير لا يمكن إنكاره على هشاشة العظام. ينبع اهتمامنا بالدخن كدواء هشاشة العظام من حقيقة أنه يحتوي على العديد من المركبات دوا النشاط المضاد للأكسدة والمضاد للالتهابات مثل الفلافونويد، الفينول وفيتوسترولس. في الجزء الثاني من هذا العمل قمنا بعرض نتائج الابحاث التي قمنا بها مع تقييمها بالموازاة مع الادبيات العلمية الخاصة بهذا الميدان.

تمثلت التجارب التي قمنا بها في البداية احداث هشاشة في العظام عند الفئران وذلك باتباع نظام غذائي عالي السرعات الحرارية واعطاء حقنات من الكظر بصفة منتظمة . ثم بعد ذلك قمنا بتقسيم الفئران الى مجموعات داوينا احدى المجموعات بالدخن واخرى بالالندرونات لمقارنة تأثير الدخن او الالندرونات على الفئران. بينت نتائج بحثنا ان محتوى المعادن في العظام اظهر تحسنا كبيرا عند الفئران المداواة بالدخن وأحيانا مع نتائج أفضل مما كانت عليه بالالندرونات خاصة بالنسبة للكالسيوم. بين التحليل النسيجي المجهرى والالكتروني فيما خص عظام الفك السفلي والفقرات القطنية، اختفاء الاضطرابات الناجمة عن الحمية و الكظر، و زوال آثاره النسيجية السلبية. وكذلك الشأن بالنسبة للكبد والغدد اللعابية حيث لا حظنا تراجع واختفاء الحويصلات الدقيقة والغليظة في انسجة هذه الاعضاء.

Résumé :

Notre travail a pour objectif d'évaluer l'action du mil à chandelle « *Pennisetum glaucum L.* » sur la fragilité osseuse en comparaison avec un biphosphonate l'alendronate. Ce travail comprend deux parties.

Dans la première partie nous avons fait une revue de la littérature axée sur la structure de l'os la fragilité osseuse et le mil à chandelle. Les données récentes montrent les avancées considérables dans la compréhension des mécanismes moléculaires qui sous tendent le remodelage osseux et sa déficience. Des facteurs locaux tels les systèmes RANK/RANKL, Wnt, l'ostéoprotégérine ... ainsi que des hormones semblent gouverner les mécanismes de différenciation des différentes catégories des cellules qui sont responsables des phénomènes résorptifs et ostéoformateurs qui fonctionnent pendant toute la vie de l'os.

La pathologie la plus fréquente dans la fragilité osseuse est représentée par l'ostéoporose post ménopausique. Les étiologies sont par ailleurs plus larges, la corticothérapie constitue un facteur de risque privilégié. Les traitements actuels comportent des molécules qui ciblent les mécanismes moléculaires intimes de l'ostéogénèse. Des traitements « alternes » prennent de plus en plus de l'importance. Ces thérapeutiques se justifient sur les plans épidémiologiques mais également diététiques.

Le mil à chandelle est réputé dans la pharmacopée traditionnelle marocaine pour avoir des actions pharmacologiques indéniables sur la fragilité osseuse, d'où l'intérêt particulier que nous avons donné à l'exploration de l'activité de cette plante. Cet intérêt découle du fait qu'elle contient de nombreux composés à activité antioxydante et anti-inflammatoire tels les flavonoïdes, les phénols et les phytostérols,

Dans la deuxième partie de ce travail nous rapportons les travaux de recherche que nous avons menés. Ces travaux comparent l'effet du mil et de l'alendronate sur des rats dont la fragilité osseuse a été induite par un régime hypercalorique et par des corticoïdes administrés en intrapéritonéal. Nous avons privilégié l'analyse histologique en microscopie ordinaire et en ultrastructure qui a montré pour la mandibule et les vertèbres lombaires, la disparition des désordres engendrés avec la présence de travées osseuses bien ordonnées et la disparition des zones d'érosion ; pour les tissus mous, nous avons observé la régression des lésions de type macro et microvésiculaires aussi bien au niveau du foie et des glandes salivaires.

La teneur en minéraux de l'os montre une nette amélioration des paramètres, chez les rats traités par le mil, avec des résultats parfois meilleurs que ceux par l'alendronate en particulier pour le calcium.

Abstract :

Our work aims to evaluate the action of pearl millet "*Pennisetum glaucum L.*" on bone fragility in comparison with a bisphosphonate alendronate. This work consists of two parts.

In the first part we did a review of the literature focused on bone structure, bone fragility and pearl millet. Recent data show considerable progress in understanding the molecular mechanisms underlying bone remodeling and its impairment. Local factors such as RANK / RANKL, Wnt, osteoprotegerin ... as well as hormones seem to govern the mechanisms of differentiation of cells categories that are responsible for the resorptive and osteoformative phenomena.

The most common pathology in bone fragility is postmenopausal osteoporosis. The etiologies are also wider, corticosteroid therapy is a privileged risk factor. Current therapies include molecules that target the intimate molecule mechanisms of osteogenesis. "Alternative" treatments are becoming more important.

Millet is famous in the traditional Moroccan pharmacopoeia for undeniable pharmacological actions on bone fragility. Our interest for this plant arises from the fact that it contains numerous compounds with antioxidant and anti-inflammatory activity such as flavonoids, phenols and phytosterols,

In the second part of this work we report our studies comparing the effect of millet and alendronate on rats whose bone fragility was induced by a hypercaloric regimen and by intraperitoneally administered corticosteroids. Histological analysis in ordinary microscopy and in ultrastructure showed for the mandible and the lumbar vertebrae the disappearance of the disorders generated with the presence of well-ordered bone spans and the disappearance of the zones erosion. For soft tissue, we observed the regression of macro and microvesicular lesions both in the liver and in the salivary glands.

The mineral content of the bone shows a marked improvement in the parameters in rats treated with millet, results sometimes were better than those with alendronate, in particular for calcium.