



**HAL**  
open science

# Physiologie intégrative du métabolisme énergétique, de l'os et de la fertilité : rôle de l'ostéocalcine et des hormones sexuelles

Cyrille Confavreux

► **To cite this version:**

Cyrille Confavreux. Physiologie intégrative du métabolisme énergétique, de l'os et de la fertilité : rôle de l'ostéocalcine et des hormones sexuelles. Sciences agricoles. Université Claude Bernard - Lyon I, 2012. Français. NNT : 2012LYO10039 . tel-00864174

**HAL Id: tel-00864174**

**<https://theses.hal.science/tel-00864174>**

Submitted on 20 Sep 2013

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

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

N° d'ordre

Année 2012

THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON  
DELIVREE PAR  
L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1  
ECOLE DOCTORALE INTERDISCIPLINAIRE SCIENCES-SANTE (EDISS)

DIPLOME DE DOCTORAT  
(arrêté du 7 août 2006)

Soutenue publiquement le 26 mars 2012 par

Cyrille B. CONFAVREUX

PHYSIOLOGIE INTEGRATIVE DU METABOLISME ENERGETIQUE, DE L'OS ET DE LA FERTILITE :  
ROLE DE L'OSTEOCALCINE ET DES HORMONES SEXUELLES

Directeur de thèse : Pr Roland CHAPURLAT

INSERM UMR 1033 - Université de Lyon - Hospices Civils de Lyon  
« *Physiopathologie, Diagnostic et Traitement des Maladies Osseuses* »  
Service de rhumatologie du pavillon F  
Hôpital Edouard Herriot  
5 place d'Arsonval  
69003 Lyon, FRANCE

Jury:

Pr Gérard KARSENTY  
Pr Patrice FARDELLONE  
Pr Marie-Hélène LAFAGE-PROUST  
Pr Michel PUGEAT

Président du jury  
Rapporteur  
Rapporteur

# UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

## **Président de l'Université**

Vice-président du Conseil d'Administration

Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie  
Universitaire

Vice-président du Conseil Scientifique

Secrétaire Général

## **M. A. Bonmartin**

M. le Professeur G. Annat

M. le Professeur D. Simon

M. le Professeur J-F. Mornex

M. G. Gay

## **COMPOSANTES SANTE**

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Directeur : M. le Professeur J. Etienne

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles  
Mérieux

Directeur : M. le Professeur F-N. Gilly

UFR d'Odontologie

Directeur : M. le Professeur D. Bourgeois

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Directeur : M. le Professeur F. Locher

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Directeur : M. le Professeur Y. Matillon

Département de formation et Centre de Recherche en  
Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur P. Farge

## COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIES

Faculté des Sciences et Technologies	Directeur : M. le Professeur F. De Marchi
Département Biologie	Directeur : M. le Professeur F. Fleury
Département Chimie Biochimie	Directeur : Mme le Professeur H. Parrot
Département GEP	Directeur : M. N. Siauve
Département Informatique	Directeur : M. le Professeur S. Akkouche
Département Mathématiques	Directeur : M. le Professeur A. Goldman
Département Mécanique	Directeur : M. le Professeur H. Ben Hadid
Département Physique	Directeur : Mme S. Fleck
Département Sciences de la Terre	Directeur : Mme le Professeur I. Daniel
UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives Observatoire de Lyon	Directeur : M. C. Collignon
Ecole Polytechnique Universitaire de Lyon 1	Directeur : M. P. Fournier
Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique	Directeur : M. G. Pignault
Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1	Directeur : M. le Professeur C. Coulet
Institut de Science Financière et d'Assurances	Directeur : M. le Professeur J-C. Augros
Institut Universitaire de Formation des Maîtres	Directeur : M. R. Bernard

**Monsieur Gérard Karsenty**

*Professor and Chair*

*Genetics Department, Columbia University – New York*

Utilisant les techniques génétiques les plus innovantes, vous avez révolutionné la vision de l'os dans le monde. Vous êtes le pionnier qui a subodoré cette nouvelle endocrinologie osseuse et vous l'avez démontré.

Sous l'impulsion de Pierre Delmas, j'ai eu la chance et l'honneur d'être votre post-doc. Comme médecin j'ai été séduit par votre faculté de vous étonner de faits cliniques pour proposer des hypothèses et répondre aux enjeux médicaux de demain. Vous m'avez transmis votre passion pour ce thème de la « nouvelle endocrinologie osseuse » qui repousse les frontières de la connaissance. J'ai été aussi profondément touché de votre attention toute paternelle durant notre expatriation avec ma famille. Ce séjour à New York dans votre laboratoire a été fondateur pour nous. J'ai appris de votre vision du monde bien au-delà de la science pure. J'ai un profond respect pour l'homme et le scientifique. Maintenir des liens étroits avec votre laboratoire me permet de poursuivre l'aventure à Lyon. C'est une grande joie pour moi.

**Madame le Pr Marie-Hélène Lafage-Proust**

*Inserm U890 – Université de St Etienne*

Parmi vos multiples fonctions vous êtes clinicienne et chercheuse. Vous connaissez parfaitement la biologie cellulaire osseuse, sa vascularisation, son interface avec le rein, et cette physiologie vous passionne. Votre enthousiasme et votre dynamisme sont communicatifs. Votre esprit ouvert et votre intérêt pour cette nouvelle endocrinologie osseuse m'ont beaucoup touché. C'est une joie et un honneur pour moi que vous ayez accepté de rapporter ce travail de thèse.

**Monsieur le Pr Patrice Fardellone**

*Inserm EA - 4292 ERI12 – Université de Picardie Jules Verne*

Nous n'avons pas eu la chance d'être votre élève. Nous profitons au quotidien dans notre activité clinique des résultats de vos travaux. Votre expertise osseuse est de grande renommée. Nous sommes très honorés et reconnaissants que vous ayez accepté d'être rapporteur extérieur érudit et objectif de notre travail qui propose une nouvelle fonction à l'os.

**Monsieur le Pr Michel Pugeat**  
*Inserm U1060 – Université de Lyon*

Vous avez toujours mené de front une activité de clinique et de recherche de haut niveau. Dans ce travail nous avons eu beaucoup de plaisir à pratiquer le raisonnement endocrinologique. L'os devient une glande, rejoint l'insuline et la fertilité : vos thèmes de prédilection. Nous attendons beaucoup de votre éclairage sur ces nouveaux concepts pour progresser dans leurs applications chez l'homme. Aujourd'hui, nous sommes très touchés que vous acceptiez de juger notre travail.

**Monsieur le Pr Roland Chapurlat**  
*Inserm U1033 – Université de Lyon*

Dans la continuité de ton enseignement pendant l'internat, je profite aujourd'hui pleinement de tes leçons cliniques objectives et basées sur les preuves au chevet du malade. Comme en témoigne cette thèse, tu m'inities à l'épidémiologie clinique ton domaine d'excellence. Tu as repris avec panache les rôles médicales, scientifiques et administratives de notre Pavillon en pleine mutation, toujours dans un souci d'excellence. Au retour de New York, tu m'as accueilli et tu as accepté d'encadrer ce travail sur la nouvelle endocrinologie osseuse, me permettant ainsi de poursuivre cette thématique passionnante. Ton esprit éclectique me donne la liberté de développer aussi les projets de rhumato-cancérologie. Accepte ma profonde et chaleureuse gratitude.

## **Chacune des étapes de cette thèse doit beaucoup à un travail d'équipe.**

### À New York

Patricia Ducy m'a encadré avec beaucoup de patience pour me transmettre la rigueur et la qualité des expériences scientifiques. Sa présence a été essentielle pour tout mon travail. Elle m'a aussi initié à l' « American way of Life ». L'estime et l'encadrement scientifique se sont doublés d'une réelle amitié. Avec Gérard, la réussite de ce séjour new-yorkais vous doit beaucoup.

Mes amis post-docs Franck Oury, Mathieu Ferron, Vijay Yadav et Na Kyung Lee. Pierre et Nadia Valla, qui nous ont accueillis comme des enfants.

### A Lyon

- Les membres de l'équipe SOPAA et spécialement Françoise Munoz, Aurélie Fontana et Jean-Paul Guastalla. L'aventure rhumato-cancérologie continue !

- Les équipes de chirurgie orthopédique pour l'étude OSMID. Tout spécialement Jacques Béjui qui m'a donné carte blanche pour ce travail dans son service alors que j'étais encore à New York. Ensuite l'accueil du Pr Carret, du Pr Herzberg, du Pr Kohler et du Pr Chotel ont été précieux. Au quotidien Gualter Vaz, Philippe Bovier-Lapierre, Vincent Pibarot, Christine Fadat et Marie-Christine Carlier. Une mention spéciale pour Olivier Borel complice de tous les instants pour les sérums et les dosages.

- Pawel Szulc qui m'a confié et épaulé avec une grande ouverture d'esprit pour mener à bien cette analyse de l'étude MINOS dont il est l'artisan. Analyse qui doit aussi beaucoup aux éclairages de Stéphanie Boutroy et Nicolas Vilayphiou.

- Avec l'étude de la fertilité, j'ai eu la joie de rencontrer Ingrid Plotton et le Pr Hervé Lejeune. Ils ont accepté avec enthousiasme et bienveillance de jouer le jeu décalé de l'hypogonadisme périphérique d'origine osseuse et d'entamer un partenariat avec New York. Je souhaite que cette aventure se poursuive !

- Tous les membres de l'unité 1033 pour leur accueil et leur discussion et particulièrement au quotidien avec Edith, Georges, Olivier, Jean-Charles, Delphine, Marie. Mon parcours scientifique doit beaucoup à son directeur Philippe Clézardin, acteur majeur de la physiopathologie des métastases osseuses dans le monde et qui m'a initié dès mon DEA à la science fondamentale. Actuellement nous débutons une nouvelle aventure de transfert entre science et malades atteints de métastases osseuses. Il guide notre projet avec dynamisme, humour, exigence et bienveillance.

- L'équipe de la Prévention des Maladies Osseuses et des densitométries.

- Emmanuelle Vignot, Elisabeth Fontanges, Déborah Gensburger, Anne Fouque-Aubert, les surveillantes, les secrétaires et tous les acteurs des services de rhumatologie du pavillon F qui aident à la réalisation de ces études en organisant avec rigueur les malades et en me libérant du temps.

*à Claire, mon épouse,  
pour ton Amour,  
ton soutien,  
notre vie new-yorkaise,  
et cette belle maisonnée pleine de Vie !*

*à Alix, Mathilde et Théodore,  
nos enfants.*

*à mes parents et Andrée Devic<sup>t</sup>.*

*à ma belle famille qui l'est vraiment.*

*au Pr Pierre Meunier, décisif dans ce choix de la rhumatologie.*

*à mes amis Marie, Stéphane et Bérengère, Nadège, Nicolas et Nathalie.*

**MERCI.**

*A LA MÉMOIRE DU PR PIERRE DELMAS†,*

## Publications relatives au travail de thèse

### 1 - ARTICLES ORIGINAUX

**Confavreux CB**, Fontana A, Guastalla J-P, Munoz F, Brun J, Delmas P.D.  
Estrogen-dependent increase in bone turnover and bone loss in postmenopausal women with breast cancer treated with anastrozole. Prevention with bisphosphonates.

*Bone* 2007 Sep; 41(3): 346-52.

AO IF 2010 = 4,6

Lee NK, Sowa H, Hinoi E, Ferron M, Ahn JD, **Confavreux CB**, Dacquin R, Mee PJ, McKee M, Jung D, Zhang Z, Kim JK, Mauvais-Jarvis F, Ducy P, Karsenty G.

Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton.

*Cell* 2007 Aug; 130(3): 456-69.

AO IF 2010 = 32,4

Yadav VK, Oury F, Suda N, Liu ZW, Gao XB, **Confavreux CB**, Klemenhagen KC, Tanaka KF, Gingrich JA, Guo XE, Tecott LH, Mann JJ, Hen R, Horvath TL, Karsenty G.

A serotonin-dependent mechanism explains the leptin regulation of bone mass, appetite, and energy expenditure.

*Cell* 2009 Sep; 138(5): 976-89.

AO IF 2010 = 32,4

**Confavreux CB**, Borel O, Lee F, Vaz G, Guyard M, Fadat C, Carlier MC, Chapurlat R, Karsenty G.

Osteoid osteoma is an osteocalcinoma affecting glucose metabolism.

*Osteoporosis Int* 2011 (e-pub June 2011)

L IF 2010 = 4,9

Oury F, Ferron M, Xu L, **Confavreux CB**, Srinivas P, Lacombe J, Huizhen W, Lugani F, Gharavi A, Lejeune H, Kumar TR, Plotton I, Karsenty G.

Evidence for a novel pancreas-bone-testis axis favoring male fertility.

*Soumis*

**Confavreux CB**, Szulc P, Boutroy S, Varennes A, Vilayphiou N, Goudable J, Chapurlat RD.

Serum osteocalcin is associated with metabolic syndrome and abdominal aortic calcifications in older men: the MINOS study.

*Soumis*

## 2 - REVUES, EDITORIAUX

---

**Confavreux CB**, Levine RL, Karsenty G.

A paradigm of integrative physiology, the crosstalk between bone and energy metabolisms.

*Mol Cell Endocrinol* 2009 Oct; 310(1-2): 21-9.

**AD IF 2010 = 4,1**

**Confavreux CB**.

Interactions between bone tissue and energy metabolism.

*Joint Bone Spine* 2010 Jun; 77: 287-9.

**AD IF 2010 = 2,5**

**Confavreux CB**.

Bone: from a reservoir of minerals to a regulator of energy metabolism.

*Kidney Int Suppl* 2011; Apr (121): S14–9.

**AD IF 2010 = 6,1**

### 3 - COMMUNICATIONS ORALES OU AFFICHEES EN 1<sup>er</sup> AUTEUR

**Confavreux CB**, Fontana A, Guastalla JP, Munoz F, Brun J, Delmas PD.

Anastrozole increases bone turnover and bone loss in postmenopausal women with breast cancer.

28<sup>th</sup> Congress of the American Society for Bone and Mineral Research (ASBMR)

Philadelphia PE USA, 15-19 septembre 2006

**Confavreux CB**, Settembre C, Oury F, Davey RA, Zajac JD, Karsenty G.

Possible central function of the calcitonin receptor on bone mass.

30<sup>th</sup> Congress of the American Society for Bone and Mineral Research (ASBMR)

Montreal Canada, 12-16 sept 2008

**Confavreux CB**, Borel O, Lee F, Vaz G, Guyard M, Carlier MC, Fadat C, Chapurlat R, Karsenty G.

Osteoid osteoma is an osteocalcinoma affecting glucose metabolism.

1<sup>st</sup> IOF-ESCEO Pre-clinical Symposium.

Valencia Spain, 22-23 mars 2011

*Oral*

**Confavreux CB**, Szulc P, Boutroy S, Varennes A, Vilayphiou N, Goudable J, Chapurlat RD.

« Ostéocalcine et métabolisme énergétique : de la paille au lit du patient.

Résultats de l'étude MINOS »

24<sup>ème</sup> Congrès de la Société Française de Rhumatologie (SFR)

Paris France, 11-14 décembre 2011

*Oral*

## 4 - COMMUNICATIONS ORALES SUR INVITATIONS

### ANGLAIS

**“The crosstalk between bone and energy metabolism”**

New therapeutic targets in renal diseases. Growth factors and crosstalk between bone and vessels.

Paris Fr, 18-19 décembre 2009

**“Bone: from a reservoir of minerals to a regulator of energy metabolism”**

50 Years of Discovery Following the Intact Nephron Hypothesis.

Munich Ge, 24-25 juin 2010

**“Bone an endocrine organ regulating energy metabolism”**

EU Calcium Myths Meeting.

Amsterdam Neth, 9 décembre 2010

### FRANÇAIS

**« Ostéoporose et nouvelle endocrinologie osseuse »**

Master européen des chirurgiens du rachis AO-Spine Course.

Paris, 25-26 Juin 2009

**« Inhibiteurs de l'aromatase : effets secondaires osseux et articulaires »**

Hormonothérapie et cancer du sein : rencontre multidisciplinaire.

Saint Etienne, 22 septembre 2009

**« Os et métabolisme énergétique »**

XIIIèmes Rencontres de Diabétologie Franco-Suisse.

Dareizé, 12-14 janvier 2012

## **Bourses et prix en lien avec le travail de thèse**

- 2003** Bourse Master Recherche de la Fondation pour la Recherche Médicale (FRM)
- 2005** Prix Jeunes Chercheurs de la Fondation Bettencourt-Schueller
- 2006** Allocation post-doctorale à l'étranger – Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC)
- 2006** Bourse de mobilité de la Société Française de Rhumatologie (SFR)
- 2007** Bourse France-Amérique de la Philippe Foundation, Inc
- 2008** Bourse France-Amérique de la Philippe Foundation, Inc
- 2011** International Osteoporosis Foundation (IOF) / European Society for Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis and Osteoarthritis (ESCEO) preclinical awards  
1st IOF-ESCEO Pre-clinical Symposium, Valencia, Spain. 22-23 Mars.

## Sommaire

### Introduction

P 20

## **Partie I : Contrôle central de la masse osseuse : la sérotonine cérébrale est un neurotransmetteur impliqué dans le contrôle par la leptine de la masse osseuse et de l'appétit**

---

### I-Introduction

P 24

### II-Hypothèse de travail

P 30

### III-Résumé de l'étude

P 31

- 1) Effet osseux de la sérotonine cérébrale
- 2) Sérotonine cérébrale et digestive
- 3) Sérotonine cérébrale et tonus sympathique
- 4) Cartographie neuronale histologique
- 5) Démonstration génétique de la cartographie neuronale impliquant la sérotonine
- 6) Connexion leptine et sérotonine cérébrale
- 7) Régulation de l'appétit et du métabolisme énergétique

### IV-Matériels et méthodes : technique d'histomorphométrie vertébrale chez la souris

P 34

- 1) Sacrifice des animaux, collecte des tissus et fixation
- 2) Déshydratation et dissection vertébrale
- 3) Infiltration du tissu osseux à froid en méthyle méthacrylate
- 4) Inclusion du tissu osseux à froid en méthyle méthacrylate
- 5) Préparation et section des blocs
- 6) Stretching et montage des lames
- 7) Coloration des lames et analyse histologique

### V- Article

P 41

### VI-Perspectives

P 56

- 1) Masse osseuse des patients sous Prozac et ISRS
- 2) Arguments en faveur d'une action centrale de la leptine
- 3) Signalisation sympathique dans l'ostéoblaste
- 4) Contrôle parasympathique de la masse osseuse

## Partie II : Régulation osseuse du métabolisme énergétique

---

### A/ L'ostéocalcine : une hormone active sur le métabolisme énergétique in vivo

I- Introduction	P 62
II- Hypothèse de travail	P 62
III- Résumé de l'étude	P 63
1) Phénotype <i>Esp</i> <sup>-/-</sup> et souris surexprimant <i>Esp</i>	
2) Les ostéoblastes sécrètent l'ostéocalcine, une hormone active sur le métabolisme énergétique	
3) L'ostéocalcine module l'insulinosensibilité via l'adiponectine	
IV- Article	P 66
V- Perspectives et évolution du modèle	P 81
1) La carboxylation, mode de régulation de l'ostéocalcine	
2) Singularité de l'action de l'ostéocalcine	
3) Rétrocontrôle du pancréas sur l'ostéoblaste par l'insuline	
4) Lien entre la résorption osseuse et le métabolisme énergétique	
5) Potentiel thérapeutique de l'ostéocalcine chez la souris	
6) Contrôle central de l'ostéoblaste et du métabolisme énergétique	
7) Ostéocalcine médiateur clé mais pas unique dans la régulation du métabolisme énergétique par l'ostéoblaste	

### B/ Action directe de l'ostéocalcine chez l'homme : étude « OSMID »

I- Introduction et hypothèse de travail	P 88
II-Résumé de l'étude	P 90
III-Focus sur l'ostéocalcine humaine et son dosage	P 91
IV- Article	P 93
V-Perspectives	P 100
1) Résorption et fenêtre de dosages	
2) Ostéome ostéoïde, ostéoblastome et technique de résection	
3) Arguments indirects de l'action de l'ostéocalcine chez l'homme : corrélation avec le diabète et le syndrome métabolique	

## **C/ Association entre ostéocalcine, syndrome métabolique et calcifications aortiques abdominales chez l'homme dans l'étude MINOS**

I- Introduction	P 102
1) Syndrome métabolique : définition, physiopathologie et risque cardiovasculaire	
2) Calcifications aortiques : pathogénie et risque cardiovasculaire	
II-Hypothèse de travail	P 105
III-Résumé	P 106
IV- Article	P 107
V-Perspectives	P 132
1) Limites de l'étude	
2) Mode d'action de l'ostéocalcine sur les calcifications artérielles	
3) Sous groupe des patients diabétiques	
4) Tertiles de calcifications aortiques spécifiques des diabétiques	
5) Valeurs extrêmes et tertiles de calcifications	

## Partie III : Os et hormones sexuelles

---

### A/ Introduction : les hormones sexuelles

I- La stéroïdogénèse	P 138
II- Les oestrogènes	P 143
1) Aromatisation	
2) Tissus sources	
3) Dégradation	
III- La testostérone	P 145
1) Action hormonale de la testostérone sur les tissus cibles	
2) Le récepteur aux androgènes	
IV- Hormones sexuelles circulantes : la SHBG	P 147
1) Taux d'hormones sexuelles circulantes chez la femme	
2) Formes circulantes libres et liées des hormones sexuelles	

### B/ Effet d'une castration chimique par les anti-aromatases chez la femme ménopausée

I- Régulation de la masse osseuse par les oestrogènes	P 149
1) Rôle physiologique des œstrogènes	
2) Mécanismes d'action des œstrogènes	
II-Oestrogènes et traitement adjuvant du cancer du sein	P 152
1) Les cancers du sein	
2) Hormonosensibilité	
3) Les Selective Estrogen-Receptor Modulators (SERM)	
4) Les anti-aromatases	
5) Anti-aromatases et hormonothérapie adjuvante	
III- Hypothèse de travail	P 156
IV- Résumé	P 159
V- Article	P 160

VI- Perspectives P 168

- 1) Perte osseuse sous anti-aromatase : résultats des sous-protocoles osseux des études princeps
- 2) Prévention de la perte osseuse induite par les anti-aromatases
- 3) Recommandations pour la prise en charge osseuse avant la mise sous anti-aromatase pour un cancer du sein hormonodépendant localisé de la femme ménopausée

**C/ Effet de l'ostéocalcine sur la physiologie de la reproduction chez l'homme**

I- Physiologie de la reproduction chez l'homme P 174

- 1) Anatomie des organes reproducteurs masculins
- 2) Spermatogenèse
- 3) Action biologique paracrine de la testostérone sur la spermatogenèse
- 4) Contrôle neuroendocrine de la fertilité masculine : « l'axe hypothalamus-hypophyse -testicule »
- 5) Contrôle osseux de la fertilité masculine par l'ostéocalcine

II- Hypothèse de travail P 187

III- Résumé P 188

- 1) Action de l'ostéocalcine sur la fertilité chez l'homme
- 2) L'axe «os-testicule» est indépendant du contrôle hypophysaire de la LH
- 3) Action de l'insuline sur la fertilité via l'ostéocalcine : vers un axe « pancréas – os – testicule »

IV- Article P 194

V- Perspectives P 251

- 1) Screening génétique des patients et limitation
- 2) Ostéocalcine et testostérone chez l'homme dans les études épidémiologiques
- 3) Résorption osseuse et fertilité

**Synthèse du modèle et perspectives** P 253

**Conclusions de thèse** P 257

**Annexes** P 259

**Références** P 264

## Table des illustrations

**Figure 1** : organisation générale du système nerveux central. Coupe sagittale.

**Figure 2** : vue schématique des différents noyaux de l'hypothalamus.

**Figure 3** : connexions neuronales et vasculaires (système veineux porte) entre l'hypothalamus et les deux lobes de l'hypophyse.

**Figure 4** : analyse histomorphométrique de la vertèbre L3. Coupe de 7  $\mu\text{m}$  après coloration Von Kossa/Van Gieson. Microscope optique. Grossissement x20. Image native (A), définition de la région d'intérêt (B), seuillage pour calcul du BV/TV (C).

**Figure 5** : contrôle central de la masse osseuse par la leptine. Le système nerveux sympathique au niveau de l'ostéoblaste bloque CREB et la prolifération des ostéoblastes et stimule ATF4 qui altère le ratio RankL/OPG et stimule la résorption osseuse.

**Figure 6** : l'ostéocalcine est une hormone osseuse qui régule le métabolisme énergétique en agissant simultanément sur l'insulinosécrétion et l'insulinosensibilité.

**Figure 7** : rétrocontrôle du pancréas sur les ostéoblastes par l'intermédiaire de l'insuline. Voie de signalisation de l'insuline dans l'ostéoblaste et facteurs de transcription impliqués.

**Figure 8** : boucle de rétrocontrôle du pancréas sur les ostéoblastes par l'intermédiaire de l'insuline et mécanismes impliquant la résorption osseuse.

**Figure 9** : la leptine freine la production d'insuline par une action directe sur le pancréas et indirecte par l'intermédiaire de l'ostéocalcine via l'action du système nerveux sympathique sur l'ostéoblaste.

**Figure 10** : le métabolisme énergétique régule la masse osseuse par l'intermédiaire d'un contrôle central de la masse osseuse.

L'os régule le métabolisme énergétique en sécrétant une hormone : l'ostéocalcine active sur le pancréas (stimulation de la sécrétion d'insuline, de la prolifération des cellules  $\beta$ ) et le tissu adipeux (augmente l'insulinosensibilité périphérique via la production d'adiponectine par les adipocytes).

**Figure 11** : facteurs influençant la minéralisation ectopique de la paroi artérielle.

**Figure 12** : mesures d'ostéocalcine dans le sous-groupe diabétique en fonction des tertiles de calcification de l'étude MINOS.

**Figure 13** : population globale des diabétiques (n=58).

**Figure 14** : population des diabétiques moins les deux patients avec une ostéocalcinémie anormalement élevée.

**Figure 15** : nomenclature IUPAC des stéroïdes; en bleu, le lettrage des cycles, en rouge la numérotation des atomes du squelette des stéroïdes (A). Les 4 cycles de A à D forment un noyau appelé le cyclopentanophénanthrène (stérane) (B).

**Figure 16** : vue globale simplifiée des grandes voies de la stéroïdogénèse.

**Figure 17** : stéroïdogénèse dans les différentes zones de la corticosurrénale. Toutes les zones expriment StAR et P450scc qui permettent l'entrée du cholestérol dans la mitochondrie et son clivage en prégnénolone. L'expression différentielle des sous-types enzymatiques dans chaque zone oriente les transformations de la prégnénolone vers la formation de l'aldostérone dans la zone glomérulaire, le cortisol dans la fasciculée et la DHEA/DHEAS dans la réticulée.

**Figure 18** : stéroïdogénèse dans les gonades. Les cellules de Leydig (testicules) et les cellules de la thèque (ovaires) expriment StAR et P450scc qui permettent l'entrée du cholestérol dans la mitochondrie et son clivage en prégnénolone.

**Figure 19** : structure et synthèse terminale des œstrogènes (aromatase).

**Figure 20** : principe de la transactivation génique par le récepteur des œstrogènes.

**Figure 21** : structure chimique du  $17\beta$ -œstradiol et des trois SERM utilisés en clinique : le tamoxifène, le torémifène et le raloxifène.

**Figure 22** : structure chimique de la testostérone, de l'androstènedione et des inhibiteurs de l'aromatase.

**Figure 23** : anatomie des organes génitaux masculins internes et externes. Coupe sagittale.

**Figure 24** : vue anatomique du contenu scrotal : testicule, epididyme et cordon spermatique.

**Figure 25** : coupe axiale d'un tube séminifère. Les cellules de Sertoli sont intratubulaires et les cellules de Leydig sont dans les espaces interstitiels.

**Figure 26** : vue synthétique montrant les différentes étapes de la spermatogénèse sur coupe axiale d'un tube séminifère : des spermatogonies périphériques en direction des spermatozoïdes relargués dans la lumière tubulaire.

**Figure 27** : étapes de divisions cellulaires au cours de la spermatogénèse.

**Figure 28** : réseau veineux porte hypothalamo-hypophysaire et sécrétion neuro-endocrine de l'hypothalamus en direction de l'antéhypophyse.

**Figure 29** : axe fonctionnel hypothalamo-hypophyso-testiculaire montrant les rétrocontrôles négatifs centraux de la testostérone et de l'inhibine.

**Figure 30 :** les souris déficientes en ostéocalcine ( $Ocn^{-/-}$ ) ont des portées moins fréquentes, des testicules de plus petite taille et un compte de spermatozoïdes diminué par rapport aux souris sauvages. Les souris  $Esp^{-/-}$ , modèle d'ostéocalcine non carboxylée plus importante, ont des testicules plus grands et un compte de spermatozoïdes augmenté.

**Figure 31 :** l'épaisseur des tubes séminifères des souris  $Ocn^{-/-}$  est plus faible que celle des souris sauvages. A l'inverse, les souris  $Esp^{-/-}$  ont une épaisseur augmentée. L'immunomarquage  $3\beta$ HSD montre des cellules de Leydig de plus faible volume avec moins d'interstitium.

**Figure 32 :** les souris déficientes en ostéocalcine ( $Ocn^{-/-}$ ) ont un déficit en stades cellulaires tardifs de la spermatogenèse (spermatocytes II et spermiogenèse).

**Figure 33 :** les souris déficientes en ostéocalcine ( $Ocn^{-/-}$ ) ont une testostérone circulante plus faible alors que chez les souris  $Esp^{-/-}$  elle est augmentée.

**Figure 34 :** le traitement d'une lignée cellulaire TM3 de cellules de Leydig par de l'ostéocalcine recombinante non carboxylée stimule l'expression des gènes nécessaires à la synthèse de la testostérone. La co-culture de cellules de Leydig avec des ostéoblastes induit la sécrétion de testostérone.

**Figure 35 :** le traitement par ostéocalcine des cellules de Leydig induit la production d'AMPc. Les souris déficientes dans les cellules de Leydig en récepteur à protéine G ( $Gprc6a^{Leydig^{-/-}}$ ) ont une testostérone basse et un compte de spermatozoïdes diminué. Les souris ( $Gprc6^{Leydig+/-}, Ocn^{+/-}$ ) ont le même phénotype que les souris  $Gprc6a^{Leydig^{-/-}}$ .

**Figure 36 :** les souris déficientes en ostéocalcine ( $Ocn^{-/-}$ ) ont une testostérone circulante plus faible. Chez les souris  $Esp^{-/-}$  elle est augmentée.

**Figure 37 :** modèle de régulation de la testostérone et de la spermatogenèse par l'ostéocalcine produite par l'os.

**Figure 38 :** résultats comparatifs de l'hyperglycémie provoquée par voie orale (75g de glucose en 3mn) chez le patient présentant la mutation F464Y de *GPRC6A* (ligne bleue) par rapport à un contrôle sain (ligne rouge). La glycémie supérieure à 11,1 mmol/L affirme le diabète. L'utilisation de l'index HOMA (homeostatic model assessment) montre clairement une insulino-résistance ( $HOMA -R = \text{blood glucose (mmol/L)} \times \text{insuline (mUI/L)} / 22,5$ ) par rapport au volontaire sain. Le volontaire sain est un homme de 33 ans, sans antécédent médical particulier, avec une vitamine D normale, un indice de masse corporelle de 23 kg/m<sup>2</sup> et une HbA1c mesurée à 5,2%.

**Figure 39 :** les souris  $InsR^{ob^{-/-}}$  ont des testicules de petite taille, un compte de spermatozoïdes diminué et une testostérone circulante basse. Les souris ( $InsR^{ob+/-}; Gprc6a^{Leydig+/-}$ ) et ( $InsR^{ob+/-}; Ocn^{+/-}$ ) reproduisent le phénotype des  $InsR^{ob^{-/-}}$  indiquant que le récepteur de l'insuline des ostéoblastes, l'ostéocalcine et le récepteur *Gprc6a* sont dans la même voie génétique.

**Figure 40** : l'axe « pancréas-os-testicule », modèle de régulation de la fertilité par l'ostéocalcine, est indépendant de l'axe hypothalamo-hypophysaire (GnRH-LH).

**Figure 41** : synthèse du modèle.

~ ~ ~ ~

**Tableau 1** : données épidémiologiques humaines concernant l'effet osseux des bêta-bloquants.

**Tableau 2** : caractéristiques du sous-groupe des 58 patients diabétiques en regard de la population globale de l'étude MINOS.

**Tableau 3** : analyse de régression logistique multivariée réalisée dans la population des patients diabétiques pour étudier l'association de chaque variable avec le seuil de calcification sévère (CAAS>4) correspondant au 3<sup>ème</sup> tertile de la population globale utilisé dans l'analyse principale.

**Tableau 4** : résultat du modèle de régression logistique multivarié pour l'association entre chaque variable et de faibles calcifications aortiques (CAAS≤4) chez les sujets diabétiques.

**Tableau 5** : résultat du modèle de régression logistique multivarié pour l'association entre chaque variable et de faibles calcifications aortiques (CAAS≤4) chez les sujets diabétiques (valeurs extrêmes enlevées).

**Tableau 6** : concentrations sériques d'œstradiol au cours de la vie chez une femme normale.

**Tableau 7** : action des œstrogènes sur les tissus cibles.

**Tableau 8** : expression tissulaire différentielle des récepteurs aux œstrogènes.

## Abréviations

ABP	Androgen Binding Protein
AMPc	Adénosine Monophosphate cyclique
ATF4	Activating Transcription Factor 4
CART	Cocaine and Amphetamine-Regulated Transcript
CREB	cAMP-Responsive Element Binding
FOXO	Forkhead box O transcription factor
FSH	Follicle-Stimulating Hormone
Glu-OCN	Ostéocalcine non carboxylée
Gla-OCN	Ostéocalcine carboxylée
GnRH	Gonadotropin Releasing Hormone
GTG	Gold ThioGlucose ou aurothioglucose
HOMA	HOmeostatic Model Assessment)
IRS	Récepteur de l'InSuline
ISRS	Inhibiteurs Sélectifs de la Recapture de la Sérotonine
LH	Luteinizing Hormone
MMA	Méthyle MéthacrylAte
MSG	MonoSodium Glutamate
NA	Noyau Arqué de l'hypothalamus
OCN	Ostéocalcine (=Bone Gla Protein /BGP)
OPG	Ostéoprotégérine
OST-PTP	OSTeOTesticular Protein Tyrosin Phosphatase
RANKL	Receptor Activator of NF-KB Ligand
SHBG	Sex Hormone Binding Globulin (= Testostérone-oestradiol Binding Globulin /TeBG)
SNP	Système Nerveux Parasymphatique
SNS	Système Nerveux Sympathique
UCP1	UnCoupling Protein 1
VMH	noyau Ventro-Médian de l'Hypothalamus
5-HT	5-hydroxytryptamine ou sérotonine

### Gènes et souris

<i><math>\alpha 1(I)</math>-Collagen Cre</i>	souris transgéniques exprimant la <i>Cre-recombinase</i> dans souris transgéniques exprimant la <i>Cre-recombinase</i> dans les ostéoblastes matures
<i>Adr<math>\beta 2</math><sup>-/-</sup></i>	souris déficientes pour le récepteur $\beta 2$ adrénergique
<i>Adr<math>\beta 2</math><sup>ob-/-</sup></i>	souris déficientes pour le récepteur $\beta 2$ adrénergique spécifiquement dans les ostéoblastes
<i>CathepsinK-Cre</i>	souris transgéniques exprimant la <i>Cre-recombinase</i> dans les ostéoclastes
<i>db/db</i>	souris déficientes pour le récepteur de la leptine ( <i>Lepr</i> ou <i>Ob-Rb</i> )
<i>DTA<sup>fl/fl</sup></i>	allèle capable d'exprimer la toxine diphtérique A (DTA) en présence d'une <i>Cre recombinase</i>
<i>Esp<sup>-/-</sup></i>	souris déficientes pour le gène de OST-PTP
<i>Htr2c<sup>-/-</sup></i>	souris déficientes pour le gène du récepteur de la sérotonine
<i>InsR<sup>-/-</sup></i>	souris déficientes pour le récepteur à l'insuline
<i>Lhb<sup>-/-</sup></i>	souris déficientes pour la sous-unité $\beta$ de l'hormone LH
<i>M3r<sup>-/-</sup></i>	souris déficientes pour le récepteur muscarinique 3
<i>ob/ob</i>	souris déficientes pour le gène de la leptine
<i>Ocn<sup>-/-</sup></i>	souris déficientes pour le gène de l'ostéocalcine
<i>Oc-CreER<sup>T2</sup></i>	souris transgéniques exprimant, en présence de tamoxifène dans l'eau de boisson, la <i>Cre recombinase</i> dans les cellules produisant de l'ostéocalcine
<i>Pomc-Cre</i>	souris transgéniques exprimant la <i>Cre-recombinase</i> dans le noyau arqué de l'hypothalamus
<i>Rosa26-Ecfp</i>	souris <i>Rosa-Ecfp</i> exprimant après recombinaison l' <i>Ecfp</i> qui est un fluorochrome montrant l'arborisation neuronale
<i>Sert-Cre</i>	souris transgéniques exprimant la <i>Cre-recombinase</i> dans les noyaux du raphé du tronc cérébral
<i>SF1-Cre</i>	souris transgéniques exprimant la <i>Cre-recombinase</i> dans le noyau VMH de l'hypothalamus
<i>Synapsin1-Cre</i>	souris transgéniques exprimant la <i>Cre-recombinase</i> dans les neurones
<i>Tph1<sup>-/-</sup></i>	souris déficientes pour l'enzyme tryptophane hydroxylase 1 présente dans le tube digestif
<i>Tph2<sup>-/-</sup></i>	souris déficientes pour l'enzyme tryptophane hydroxylase 2 présente dans le cerveau

**Manuscript**

## Introduction générale

L'arrivée des technologies de souris transgéniques a ouvert une ère nouvelle pour la physiologie intégrative avec la possibilité d'étudier la fonction d'un gène au sein d'un organisme vivant <sup>1,2</sup>. De véritables révolutions dans nos connaissances physiologiques ont ainsi été rendues possibles. Au niveau osseux, la découverte du rôle, jusqu'alors insoupçonné, de l'os sur le métabolisme énergétique et la fertilité par l'équipe du Pr Gérard Karsenty en est un exemple majeur <sup>3</sup>.

Sur les recommandations du Pr Pierre Delmas, qui a été un des pionniers de la découverte de l'ostéocalcine et de son dosage dans les années 80 <sup>4, 5, 6, 7</sup>, j'ai passé deux ans dans le laboratoire de génétique du Pr Karsenty à la Columbia University, New-York, USA, pour apprendre la physiologie intégrative et la génétique osseuse. À mon retour à Lyon, j'ai eu la chance de trouver l'oreille attentive du Pr Roland Chapurlat qui a accepté d'encadrer mon travail sur « *la nouvelle endocrinologie osseuse* » et de me permettre de poursuivre la collaboration avec l'équipe new-yorkaise. J'ai ainsi pu participer aux découvertes en biologie fondamentale et contribuer à leur transfert chez l'homme.

Cette thèse, présentée sous forme de « thèse-article », reprend l'ensemble du chemin parcouru depuis l'action, relativement classique, des œstrogènes sur l'os jusqu'à la description chez l'homme et la souris d'un nouvel axe « *pancréas (insuline) - os (ostéocalcine) - testicules (testostérone)* » régulant la fertilité.

La règle cardinale qui sous-tend la physiologie intégrative est celle de l'homéostasie. En effet, le corps humain est un organisme multicellulaire dont les cellules peuvent se différencier de très nombreuses façons. On compte plus de 200 types différents de spécialisation cellulaire <sup>8</sup>. Le plus souvent les cellules spécialisées se regroupent en colonies et s'organisent en tissus. Classiquement, plusieurs tissus s'arrangent dans l'espace de façon optimale pour assurer un rôle précis dans l'organisme et forment un organe. Ensuite, plusieurs organes sont mis en réseau entre eux pour assurer une des grandes fonctions de l'organisme. Réaliser cette fonction implique une coordination parfaite entre les organes nécessitant de multiples moyens de communication. Par exemple, l'estomac accueille le bol alimentaire, le stocke, le digère, et le transfère à l'intestin grêle. Ainsi participe-t-il à la grande fonction de la digestion.

Au cours de l'évolution, la spécialisation cellulaire et le partage des tâches ont été un élément déterminant pour l'apparition des organismes multicellulaires complexes. Malgré leur organisation et leur fonction propre, tous les éléments du corps fonctionnent collectivement pour maintenir l'intégrité du corps et la vie. Même devant des variations parfois importantes de l'environnement extérieur, l'environnement interne est maintenu remarquablement stable pour permettre un fonctionnement optimal aux milliards de cellules de l'organisme. Le premier à avoir identifié cette constance du « milieu intérieur » fut Claude Bernard en 1865. Une telle stabilité résulte en fait d'un ensemble de mécanismes intégratifs de régulation des organes appelé homéostasie, terme inventé par Walter B. Cannon et publié pour la première fois en 1932 dans son livre « *The Wisdom of the Body* ». L'homéostasie est

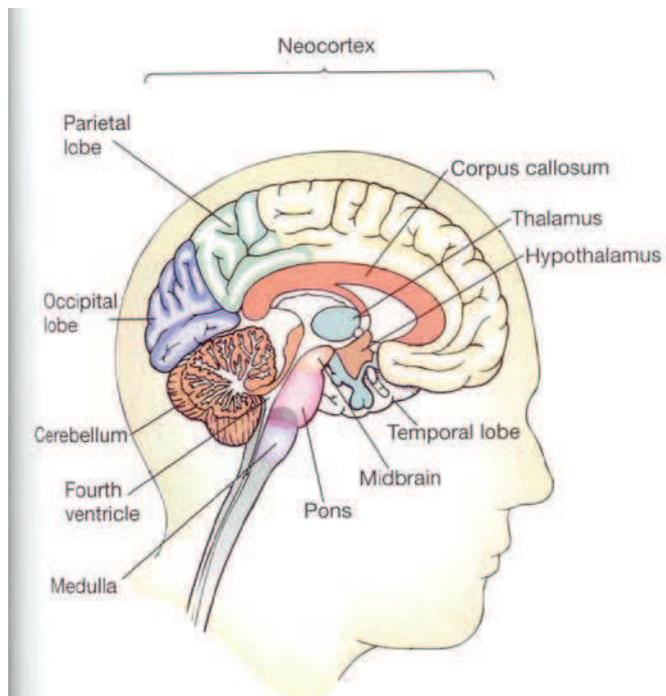
un équilibre dynamique qui repose sur des systèmes de rétrocontrôles négatifs impliquant des récepteurs et des effecteurs pour revenir en permanence à la valeur de référence. Les systèmes de contrôle de l'homéostasie regroupent le système nerveux autonome, basé sur des communications neuronales entre la périphérie et le cerveau via des récepteurs (par exemple barorécepteurs, chémorécepteurs, thermorécepteurs) et des effecteurs comme le système nerveux autonome (sympathique ou parasympathique) et le système endocrinien. Il n'est pas rare que les deux systèmes travaillent ensemble pour obtenir une réponse coordonnée. Ainsi par exemple une diminution de pression artérielle est-elle détectée immédiatement par le barorécepteur. En réponse, on observe une stimulation directe du rythme cardiaque et la sécrétion de noradrénaline et d'hormone antidiurétique (ADH).

L'hypothalamus est le lieu d'intégration le plus élevé entre le système endocrinien et le système nerveux autonome pour élaborer des réponses complexes et maintenir l'homéostasie. L'hypothalamus est situé à la base du cerveau, à la partie inférieure du troisième ventricule, entre en avant le chiasma optique, latéralement les bandelettes optiques et en arrière les tubercules mamillaires. Figure 1. L'hypothalamus possède de nombreux chémorécepteurs sanguins. Il reçoit également des projections neuronales en provenance des aires cérébrales corticales et sous-corticales. Sa caractéristique est d'être un carrefour d'intégration des informations du milieu intérieur pour maintenir l'homéostasie. Les neurones de l'hypothalamus se regroupent fonctionnellement en noyaux (figure 2) pour exercer leur fonction qui s'exprimera par voie neuroendocrine via l'axe hypothalamo-hypophysaire (figure 3) ou par voie neurologique via le système nerveux autonome sympathique et parasympathique en projetant sur le tronc cérébral au niveau du métencéphale (ou pont de Varole) et le tractus intermedio lateralis dans la corne latérale de la moelle.

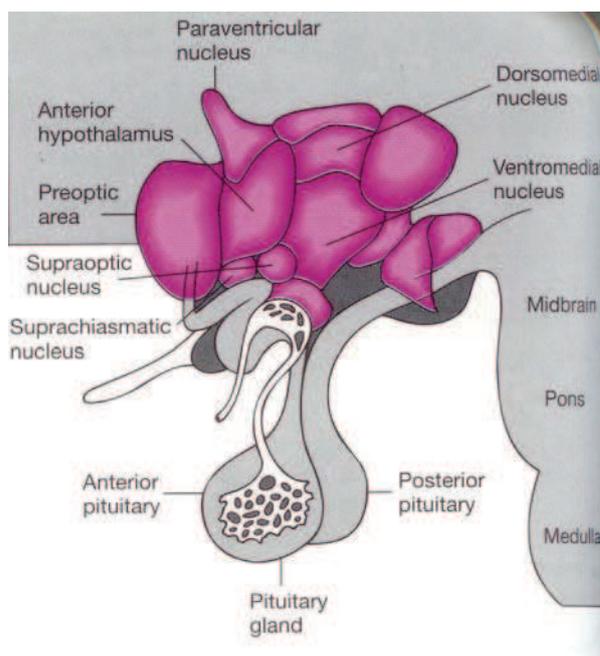
Une des fonctions du squelette est d'assurer la locomotion. En un sens, la locomotion peut être considérée comme une fonction de survie pour notre espèce. Le maintien d'os de bonne qualité mécanique et la réparation spontanée de fracture sont assurés par le remodelage osseux. Celui-ci permet donc le maintien constant chez l'adulte du tissu osseux et peut être vu comme une fonction homéostatique. Il s'agit d'un processus fortement consommateur en énergie. Dès lors, sur la base de notre compréhension de l'homéostasie et de la physiologie intégrative, il est possible de concevoir un système physiologique intégrant l'os, le métabolisme énergétique et l'hypothalamus. C'est cette conviction qui a poussé le Pr Karsenty sur la voie d'une nouvelle physiologie osseuse complémentaire aux fonctions déjà connues de protection, de locomotion et d'homéostasie phosphocalcique du squelette<sup>3, 9, 10</sup>.

Je présenterai ici mon travail réalisé dans son laboratoire puis à Lyon replacé au sein de l'ensemble du modèle développé depuis une quinzaine d'années. Je suivrai un plan en trois parties : le contrôle central de la masse osseuse et le rôle de la sérotonine cérébrale, la régulation osseuse du métabolisme énergétique par l'ostéocalcine chez l'animal et chez l'homme et enfin le lien entre os et hormones sexuelles.

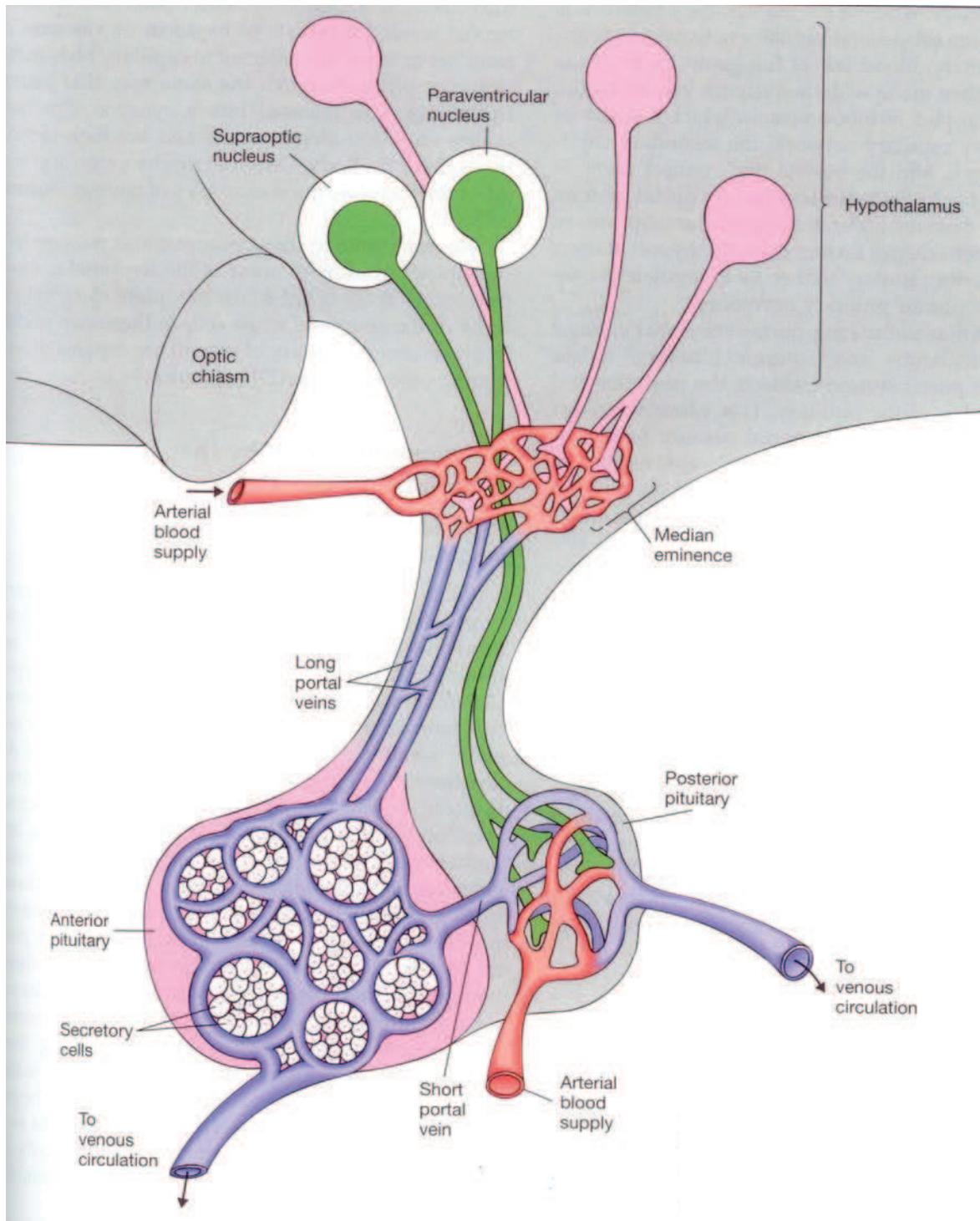
**Figure 1 :** organisation générale du système nerveux central. Coupe sagittale. D'après Rhoades and Pfanzer, Saunders. 1996. <sup>8</sup>



**Figure 2 :** vue schématique des différents noyaux de l'hypothalamus. D'après Rhoades and Pfanzer, Saunders. 1996. <sup>8</sup>



**Figure 3 :** connexions neuronales et vasculaires (système veineux porte) entre l'hypothalamus et les deux lobes de l'hypophyse.  
D'après Rhoades and Pfanzer, Saunders, 1996. <sup>8</sup>



# Partie I : Contrôle central de la masse osseuse : la sérotonine cérébrale est un neurotransmetteur impliqué dans le contrôle par la leptine de la masse osseuse et de l'appétit

## I- Introduction

En clinique, une perte osseuse succède invariablement à une insuffisance gonadique qu'elle soit par déficit oestrogénique après la ménopause ou par déficit androgénique chez l'homme après castration chimique ou chirurgicale. A l'inverse, l'obésité réduit le risque d'ostéoporose et de fracture. Cette double observation autour de l'ostéoporose suggère que l'os, l'appétit et la reproduction pourrait être régulée par un système physiologique hormonal commun.

La leptine découverte par Friedman <sup>11, 12</sup> est une hormone protéique de 16kDa qui est produite par les adipocytes blancs mais non par la graisse brune. Elle est libérée dans le sang et agit dans le cerveau par l'intermédiaire d'un récepteur unique Ob-Rb. En effet, le gène du récepteur de la leptine (*Ob-R* ou *LepR*) produit 6 isoformes différents de récepteur (Ob-Ra -> Ob-Rf) mais seul Ob-Rb est capable de transmettre un signal intracellulaire via la cascade des MAP kinases et de JAK-STAT. La leptine franchit la barrière hémato-encéphalique au niveau des plexus choroïdes et sa concentration dans le système nerveux central est proportionnelle à sa concentration plasmatique.

Le récepteur de la leptine est exprimé au niveau de l'hypothalamus et du tronc cérébral. La leptine est considérée comme l'hormone qui transmet au cerveau les informations concernant les réserves énergétiques du corps. Son rôle est d'inhiber au niveau cérébral l'appétit et de stimuler la dépense énergétique et la fertilité. Par conséquent les souris déficientes en leptine (*ob/ob*) ou son récepteur (*db/db*) sont obèses et hypogonadiques.

Comme la leptine est une molécule essentielle du contrôle de l'appétit, du métabolisme énergétique et de la fertilité <sup>13</sup>, elle pourrait être un bon dénominateur commun d'un système physiologique liant l'os, l'appétit et la reproduction. De plus, durant l'évolution, la leptine et le remodelage osseux sont apparus simultanément <sup>3</sup>.

La première étape fut d'évaluer si les souris déficientes en leptine présentaient ou non un phénotype osseux. L'analyse histomorphométrique vertébrale des souris *ob/ob* a montré une augmentation de leur masse osseuse liée à une augmentation de l'activité de formation osseuse <sup>14</sup>. Pour savoir si la leptine contrôle la masse osseuse par son action cérébrale au niveau de l'hypothalamus et du tronc cérébral, des souris *ob/ob* -donc déficitaires en leptine- ont reçu de la leptine ou du sérum physiologique injectés en intracérébroventriculaire. A l'issue de l'expérience, l'analyse histomorphométrique vertébrale a montré une correction de la masse osseuse des souris *ob/ob* traitées par la leptine alors que les souris traitées avec le sérum physiologique conservaient une masse osseuse élevée. Cette expérience suggère une action indirecte et centrale de la leptine sur la masse osseuse. Dans

d'autres modèles, ce contrôle central n'est pas retrouvé<sup>15-19, 20, 21, 22</sup> et pose la question, plus largement que celle d'une action directe de la leptine sur les ostéoblastes, des relations entre le tissu adipeux intramédullaire et l'os.

L'étape suivante consiste à déterminer comment le système nerveux central régule la masse osseuse. En clinique, l'algodystrophie est une pathologie surprenante, caractérisée par la survenue rapide d'une atteinte très douloureuse et pseudo-inflammatoire locorégionale d'un membre. La douleur est permanente, intense et responsable d'une impotence fonctionnelle. Elle touche classiquement le poignet, la main, l'épaule, la hanche ou le pied. Biologiquement aucun syndrome inflammatoire n'est retrouvé. Radiologiquement, sur des clichés comparatifs, il existe une déminéralisation de la zone concernée (ostéoporose pommelée) mais un respect de l'interligne articulaire permettant d'écarter une atteinte inflammatoire ou infectieuse. Ce tableau clinique s'accompagne habituellement d'un œdème de la zone douloureuse, de troubles vasomoteurs avec horripilation et hypersudation. Elle peut se rencontrer à la suite d'un traumatisme du membre, d'une intervention chirurgicale ou dans un contexte de pathologie générale (infarctus, stress chirurgical...). Par rapport à notre problématique, l'algodystrophie associe une déminéralisation osseuse et une dérégulation du système nerveux sympathique. Elle est bien connue des neurologues qui l'observent comme une complication fréquente -parfois révélatrice- d'une lésion cérébrale controlatérale (lésion tumorale, accident ischémique...) et des traitements par barbituriques (Gardéna<sup>®</sup>). De plus, il a été suggéré que l'algodystrophie pourrait être améliorée par un traitement de bêtabloquant non sélectif de type propanolol (Avlocardyl<sup>®</sup>)<sup>23-25</sup>. Expérimentalement, la mesure du tonus sympathique chez les souris *ob/ob* déficientes en leptine est basse. L'ensemble de ces observations cliniques et biologiques convergent et suggèrent un contrôle central de la masse osseuse médié par le système nerveux sympathique.

La première expérience clé permettant de démontrer ce mécanisme est une expérience de parabiose au cours de laquelle deux souris *ob/ob* sont opérées de façon à établir une circulation sanguine commune. Une des souris est ensuite traitée par injection intracérébroventriculaire de leptine durant un mois. Les souris sont ensuite sacrifiées et analysées par histomorphométrie. La souris traitée par la leptine présente une correction de sa masse osseuse alors que la souris partenaire conserve une masse osseuse augmentée. Ceci indique que le contrôle central de la masse osseuse emprunte une voie neuronale et non pas hormonale<sup>26</sup>.

Au cours de la seconde expérience qui porte sur le tonus sympathique, les souris *ob/ob* sont traitées pendant 40 jours avec un agoniste bêta adrénergique (isoproterénol). À l'issue du traitement, les souris traitées par l'isoproterénol restent obèses, donc sans modification de leur poids et de leur appétit. En revanche l'analyse histomorphométrique vertébrale montre une correction de la masse osseuse par rapport aux souris traitées avec le sérum physiologique<sup>26</sup>. Le résultat de cette expérience a été par la suite vérifié génétiquement puisque la masse osseuse des souris déficientes en leptine avec en plus délétion d'un des récepteurs bêta 2 adrénergiques spécifiquement au niveau des ostéoblastes (*ob/ob ; Adrβ2<sup>ob+/-</sup>*) est normalisée indiquant que leptine et le tonus sympathique sont dans la même voie génétique<sup>27</sup>.

Dans une étude indépendante française, Bonnet *et al.* ont confirmé l'expression des récepteur bêta 2 adrénergiques par les ostéoblastes et l'absence de récepteur bêta 1 adrénergique. Ils ont également montré que le propranolol à faible dose était capable de prévenir la perte osseuse induite par l'ovariectomie chez la rate. L'effet osseux provenait simultanément d'une augmentation de la formation osseuse (30% MAR,  $p=0.01$ ) et d'une diminution de la résorption (-52% OcS  $p=0.01$ ) par rapport au placebo. Les études biomécaniques complémentaires réalisées sur les os après sacrifice ont montré une augmentation de leur résistance. Les auteurs précisent que les doses utilisées de propranolol étaient faibles et n'induisaient pas d'effet cardiovasculaire<sup>28</sup>. Dans une expérience précédente, la même équipe avait montré toujours dans un modèle de rates ovariectomisées que l'exercice physique et le propranolol prévenait la perte osseuse induite par l'ovariectomie avec notamment une augmentation du nombre et de l'épaisseur des travées osseuses. Ils avaient observé un effet additif du propranolol et de l'exercice physique<sup>29</sup>.

Il existe actuellement un seul traitement ostéoformateur disponible dans la pratique clinique : c'est la parathormone administrée par voie sous-cutanée de façon intermittente quotidienne. Chez les souris ovariectomisées, l'effet de la parathormone et des bêtabloquants a été comparé par Pierroz *et al.* L'effet anabolique de la parathormone a été clairement retrouvé sur tous les sites mesurés en densitométrie osseuse. Pour le propranolol, la perte osseuse induite par l'ovariectomie a été prévenue seulement au niveau de la densitométrie du corps entier mais pas à la hanche ou à la colonne. En revanche la combinaison de la parathormone et du propranolol avait un effet synergique par rapport à la parathormone seule. En histomorphométrie, le traitement combiné permet une augmentation de la formation osseuse au niveau cortical, au niveau des surfaces trabéculaires, une augmentation du nombre d'ostéoblastes et une amélioration de la minéralisation.<sup>30</sup>

Ces découvertes biologiques ont suscité l'intérêt des cliniciens pour l'utilisation des bêtabloquants dans la prévention du risque fracturaire d'autant plus que ces traitements sont déjà largement prescrits dans la prévention du risque cardiovasculaire et que les deux populations de patients se recoupent. L'étude princeps ayant analysé le risque fracturaire et les bêtabloquants est celle de Schlienger *et al.* réalisée en Angleterre en utilisant les données du registre « UK General Practice Research Database (GPRD) ». C'est une étude cas-témoins avec 30601 cas et 120819 témoins appariés sur l'âge, le sexe et le médecin généraliste. Après ajustement sur le tabagisme, l'index de masse corporelle, les autres anti-hypertenseurs, les psychotropes, les œstrogènes, les statines et les antiépileptiques, les auteurs ont observé sur une période de 6 ans une réduction du risque fracturaire avec la prise de bêtabloquant en monothérapie (HR = 0.77; 0.72-0.83) ou en association avec un thiazidique (0.71 ; 0.64-0.79)<sup>31</sup>. Plusieurs autres études sont également en faveur d'une prévention du risque fracturaire par les bêtabloquants.

L'étude GEELONG est une autre étude cas-témoins monocentrique réalisée en Australie chez 569 femmes fracturées comparées à 775 femmes non fracturées. Après ajustement sur l'âge, le poids, le mode de vie et les traitements, les auteurs ont observé une densitométrie osseuse plus élevée à la hanche totale (2.5%,  $p = 0.03$ ) chez les patientes traitées par bêtabloquants ainsi qu'une réduction du risque fracturaire global (OR= 0.68 ; 0.49-0.96)<sup>32</sup>.

L'étude australienne DUBO a suivi 3488 patients de plus de 50 ans dont 262 hommes et 411 femmes étaient sous bêtabloquants. Après 10 ans de suivi, il existait, aussi bien chez les hommes que chez les femmes un gain significatif de masse osseuse en lombaire et en fémoral. Les patients sous bêtabloquants avaient également une réduction du risque fracturaire indépendamment de l'âge, la BMD et les facteurs de risques cliniques avec un *odds-ratio* de 0.49 (0.32-0.75) pour les hommes et de 0.68 (0.53-0.87 pour les femmes <sup>33</sup>.

L'étude allemande MONICA à Augsburg, réalisée chez 1793 patients âgés de 55 à 74 ans, avec un suivi de 10,7 ans a également montré une réduction du risque fracturaire chez les patients traités par bêtabloquants (OR= 0.60; 0.38-0.95) après ajustement sur l'âge, le sexe, l'index de masse corporelle, le niveau d'éducation et les facteurs de risque cliniques <sup>34</sup>.

L'étude jointe entre les bases de données hollandaises de PHARMO RLS (Record Linkage System) et anglaises de GPRD a montré un effet protecteur osseux des bêtabloquants dans chacune des populations (OR ajusté = 0.87 ; 0.80-0.95 et 0.82 ; 0.74-0.91 respectivement) <sup>35</sup>. Toutefois les auteurs estiment dans leur conclusion que l'association entre les bêtabloquants et le risque fracturaire ne serait pas causal.

Par ailleurs des données épidémiologiques négatives ont été publiées et ont alimenté la controverse sur le bénéfice des bêtabloquants dans la réduction du risque fracturaire. Certaines études portent sur un effectif faible et des critères intermédiaires. C'est le cas de l'étude l'espagnole de Perez-Castrillon *et al.* réalisée pendant un an chez 40 hommes (30 sous bêtabloquants/10 non traités) dans les suites d'un infarctus du myocarde. L'analyse de la densitométrie à la hanche à 1 an n'a pas montré de différence de masse osseuse <sup>36</sup>.

Une autre étude espagnole de type cas-témoins cette fois, réalisée chez 74 femmes ménopausées ayant présenté un événement cardio-vasculaire et 111 témoins appariés sur l'âge et le sexe a montré que la densitométrie osseuse des patientes traitées par bêtabloquants était significativement plus élevée à la hanche que celle des contrôles. Il n'y avait pas de différence significative de la prévalence des fractures par fragilité. Ces deux études posent la question de l'effectif et de la comparabilité des deux populations. En effet dans cette dernière étude les patientes présentant une maladie cardiovasculaire avaient une prévalence significativement plus élevée d'hypertension artérielle, d'hyperlipidémie, consommaient plus de bêtabloquants, de statines et moins d'alcool <sup>37</sup>.

L'étude de Reid *et al* a porté sur l'analyse du remodelage osseux chez 41 femmes ménopausées randomisées entre placebo et propranolol à la dose de 160 mg par jour pendant trois mois. Les auteurs ont observé sous bêtabloquants une diminution de l'ostéocalcine mais pas de modification des autres marqueurs de formation osseuse. Le marqueur de résorption avait une faible diminution dès six semaines qui persistait ensuite <sup>38</sup>. On note que par rapport aux études expérimentales publiées par Bonnet, la dose utilisée est forte et antihypertensive.

Cette même équipe a publié simultanément les résultats également négatifs de l'association entre la densitométrie osseuse, le risque fracturaire et l'utilisation de

bêtabloquants dans l'étude SOF (Study of Osteoporotic Fractures). Il s'agit d'une cohorte prospective de 8412 patientes. Dans cette étude 1099 femmes étaient traitées par bêtabloquants et ont été suivies pendant sept ans. L'existence d'un traitement bêtabloquant a été recueillie uniquement à partir de la quatrième visite. De façon transversale lors de cette visite, la densitométrie à la hanche totale était supérieure dans le groupe traité (0,746 vs 0,735 g/cm<sup>2</sup>) mais la différence ne restait pas significative après ajustement. Dans cette étude, la population traitée par bêtabloquants était différente de la population non traitée avec un poids et une tension significativement plus élevée, plus d'utilisation de thiazidiques, d'oestrogènes, de statines et moins de corticoïdes ou de tabac. De façon longitudinale, sur une période de suivi de quatre ans, l'utilisation des bêtabloquants n'avait pas d'effet sur la perte osseuse densitométrique à la hanche. Sur les 7 ans total de suivi, les patientes sous bêtabloquants avaient une tendance non significative à la réduction du risque fracturaire global (0.92 ; 0.81- 1.05) ou du poignet (0.74 ; 0.54-1.01). Le résultat était par contre significatif pour la fracture du col du fémur (0.76 ; 0.58-0.99)<sup>39</sup>.

Dans l'étude multicentrique française EPIDOS (5 centres) portant sur 7598 femmes âgées (80.5 ans en moyenne) de la population générale suivie pendant 3 ans et demi en moyenne, 1311 fractures non-vertébrales ont été observées. Deux cent quatre vingt trois femmes (3.6%) prenaient un bêtabloquant (dont 97 sous sotalol et 93 sous propranolol). Il n'a pas été observé d'effet significatif des bêtabloquants après ajustement sur la densitométrie osseuse ni sur le risque fracturaire<sup>40</sup>. A partir de cette étude négative, il est intéressant de souligner que les différentes classes de bêta-bloquants n'ont pas forcément le même effet osseux. D'après les données expérimentales<sup>28</sup>, les bêtabloquants qui seraient le plus intéressants pour l'os seraient des bêta 2 sélectifs. Ceux-ci n'existent pas. On dispose actuellement en clinique soit de bêtabloquants non-sélectifs (propranolol) soit de cardiosélectifs (bêta 1 sélectifs) dont l'effet pourrait être délétère au plan osseux. Tableau 1.

## CONCLUSION INTERMEDIAIRE

**La leptine par son action cérébrale inhibe la formation osseuse de façon indirecte par l'intermédiaire du système nerveux sympathique.**

**Tableau 1 :** données épidémiologiques humaines concernant l'effet osseux des bêta-bloquants.

<b>Etude</b>	<b>Design</b>	<b>Population</b>	<b>Type de fracture</b>	<b>HR ou OR (95%CI)</b>	<b>Références</b>
SOF	Cohorte prospective	8412 (13% traitées)	Hanche Toutes	0.76 (0.58-0.99) 0.92 (0.81-1.05)	Reid 2005
GPRD	Cas-témoins	120819 témoins (17% traités) 30601 cas (16% traités)	Toutes	0.77 (0.72-0.83)	Schlienger 2004
GEELONG	Cas-témoins	775 témoins (14% traités) 569 cas (10% traités)	Hanche Toutes	0.68 (0.52-0.89) 0.69 (0.49-0.96)	Pasco 2004
PharmoRLS	Cas-témoins	26341 témoins 6763 cas	Hanche	0.87 (0.80-0.95)	De Vries 2007
MONICA	Cohorte prospective	1793 patients 263 fractures	Toutes	0.60 (0.37-0.96)	Meisinger 2007
DUBO	Cohorte prospective	1285 hommes (20% traités) 2203 femmes (19% traitées)	Toutes	0.49 (0.32-0.75) 0.68 (0.53-0.87)	Yang 2011
EPIDOS	Cohorte prospective	7598 (3.8% traitées)	Non vertébrales	1.2 (0.9-1.5)	Levasseur 2005
	Suivi patients traités ou non après un infarctus	40 hommes (75% traités)	Moyenne DMO au col fémoral à 1 an	ns	Perez-Castrillon 2007
	Cas-témoins	74 femmes ayant eu un infarctus 111 témoins appariés sur l'âge	Toutes	ns	Sosa 2011

## II- Hypothèse de travail

Le récepteur de la leptine est unique et exprimé à la fois dans le tronc cérébral et dans l'hypothalamus au niveau des noyaux arqués (NA) et des noyaux ventro-médians (VMH). Les expériences d'injection de la leptine en intracérébroventriculaire réalisées jusqu'à présent sont suffisamment précises pour que la leptine demeure au niveau cérébral à l'intérieur de la barrière hémato-encéphalique. En revanche, anatomiquement, il n'est pas possible durant cette injection de séparer l'action de la leptine sur l'hypothalamus ou le tronc cérébral. Pour contourner cette difficulté, des expériences de destruction chimique ciblant les noyaux hypothalamiques ont été réalisées.

L'injection de leptine en intraventriculaire après destruction chimique spécifique des noyaux ventro-médians de l'hypothalamus (VMH) par le GTG (gold thioglucose) chez les souris *ob/ob* ne permet plus la correction de la masse osseuse et montre que les noyaux hypothalamiques VMH sont impliqués dans le contrôle de la masse osseuse. La correction de l'hyperphagie reste obtenue.

La même expérience réalisée après destruction chimique des noyaux arqués (NA) par le MSG (monosodium glutamate) n'empêche pas la correction de la masse osseuse par l'injection de leptine mais empêche la correction de l'hyperphagie indiquant que les noyaux arqués sont nécessaires au contrôle de l'appétit par la leptine.

Face à ces expériences de destruction chimique ciblée mais globale et aveugle des noyaux hypothalamiques, l'analyse osseuse des souris spécifiquement déficientes au niveau du VMH en récepteur de la leptine (*ObRb*) ne montre pas de phénotype osseux<sup>41</sup>. Ces résultats pourraient être vus comme une contradiction apparente. Si on en reste aux résultats bruts uniquement, ils indiquent que le noyau VMH de l'hypothalamus et le noyau arqué sont nécessaires pour respectivement le contrôle central de la masse osseuse et le contrôle de l'appétit par la leptine mais que le récepteur de la leptine à ce niveau n'est pas nécessaire.

**L'hypothèse soulevée est donc que la leptine régule la masse osseuse et l'appétit de façon indirecte en amont de l'hypothalamus au niveau du tronc cérébral, autre lieu d'expression du récepteur, qui transmettrait ensuite l'information au niveau de l'hypothalamus.**

### III- Résumé de l'étude <sup>42</sup>

Pour savoir si la leptine agit en amont de l'hypothalamus, nous avons passé en revue les différents neurotransmetteurs à la recherche d'un candidat qui puisse réguler à la fois la masse osseuse et l'appétit. Notre intérêt s'est concentré sur la sérotonine. La sérotonine est une indole-amine produite dans les cellules entérochromaffines et dans les neurones sérotoninergiques du tronc cérébral. Elle ne traverse pas la barrière hémato-encéphalique et les deux systèmes –central et périphérique- sont indépendants <sup>43</sup>. Chez les invertébrés, la sérotonine stimule fortement l'appétit <sup>44</sup>. De nombreux autres rôles ont été décrits pour la sérotonine cérébrale mais pour l'instant aucun travail n'a porté sur l'étude de la masse osseuse <sup>45</sup>. En revanche, notre laboratoire a récemment mis en évidence que la sérotonine périphérique régule la formation osseuse <sup>46</sup> nous incitant à étudier si la sérotonine cérébrale possède aussi une action osseuse.

#### 1) Effet osseux de la sérotonine cérébrale

La sérotonine est produite à partir du tryptophane par hydroxylation sous l'influence de l'enzyme tryptophane hydroxylase 2 (Tph2) dans le cerveau et Tph1 dans le tube digestif <sup>47</sup>. La génération de souris déficientes en *Tph2* permet donc d'obtenir un déficit uniquement en sérotonine cérébrale et ces souris ont une sérotonine circulante normale.

L'analyse du phénotype osseux des souris *Tph2*<sup>-/-</sup> révèle une masse osseuse basse aussi bien au niveau des os longs qu'au niveau vertébral. Ce phénotype résulte de la combinaison d'une diminution de la formation et d'une augmentation de la résorption osseuse. La minéralisation osseuse chez ces souris est normale.

Ce premier résultat montre que la sérotonine cérébrale est un stimulateur important de la masse osseuse. Il indique aussi qu'un neurotransmetteur peut avoir un effet sur la physiologie osseuse.

#### 2) Sérotonine cérébrale et digestive

Les résultats précédents indiquent un rôle opposé sur la masse osseuse entre la sérotonine périphérique d'origine digestive et la sérotonine cérébrale. Pour déterminer quelle sérotonine est prépondérante, nous avons généré des souris doublement déficientes (*Tph1*<sup>-/-</sup>; *Tph2*<sup>-/-</sup>). Elles reproduisent le phénotype de masse osseuse basse des souris *Tph2*<sup>-/-</sup> permettant de conclure que la sérotonine cérébrale est prépondérante.

#### 3) Sérotonine cérébrale et tonus sympathique

Le phénotype osseux des souris *Tph2*<sup>-/-</sup> apparaît en miroir de celui des souris déficientes en récepteur bêta 2 adrénergiques (*Adrb2*<sup>-/-</sup>) qui ont un tonus sympathique effondré, suggérant que l'effet osseux de la sérotonine cérébrale passerait par le tonus sympathique. Le dosage de la noradrénaline et l'expression dans la graisse brune de *Ucp1* des souris *Tph2*<sup>-/-</sup> sont élevés ce qui signe une augmentation du tonus sympathique et confirme l'aspect en miroir du phénotype. La démonstration génétique a été apportée par les souris (*Tph2*<sup>-/-</sup>; *Adrb2*<sup>+/-</sup>) qui ont un

phénotype osseux et un tonus sympathique normalisés indiquant que la sérotonine cérébrale et le tonus sympathique sont dans la même cascade génétique.

#### 4) Cartographie neuronale histologique

Deux expériences ont permis la démonstration de la projection axonale des neurones sérotoninergiques sur l'hypothalamus. La première expérience est génétique et utilise le croisement des souris *Rosa26-Ecfp* avec des souris *Sert-Cre*. Les souris *Rosa-Ecfp* expriment après recombinaison l'*Ecfp* qui est un fluorochrome montrant l'arborisation neuronale. Les souris *Sert-Cre* expriment la *Cre-recombinase* dans les noyaux du raphé du tronc cérébral qui contiennent des neurones sérotoninergiques. L'analyse histologique du cerveau des souris (*Rosa26-Ecfp* ; *Sert-Cre*) révèle une fluorescence du noyau arqué et du VMH de l'hypothalamus ce qui indique que les noyaux du raphé projettent dans le VMH.

La seconde méthode d'analyse des projections axonales repose sur le marquage du noyau du tronc cérébral (raphé) avec du Dextran immédiatement après sacrifice de l'animal. Cette expérience utilise la persistance pendant un court laps de temps, malgré la mort de l'animal, d'un transport axonal antérograde. L'analyse histologique de l'hypothalamus a montré un marquage du VMH et du noyau arqué. L'expérience a été répétée en utilisant le transport axonal rétrograde. Dans cette expérience complémentaire, le marquage de l'hypothalamus a montré un marquage des corps neuronaux dans le raphé.

#### 5) Démonstration génétique de la cartographie neuronale impliquant la sérotonine

Les deux expériences précédentes signent l'existence de projections axonales à partir des noyaux du raphé dans le tronc cérébral en direction du VMH et du noyau arqué de l'hypothalamus mais n'indiquent pas clairement la nature sérotoninergique de ces neurones qui reste à démontrer.

L'analyse par RT-PCR de l'expression du récepteur de la sérotonine (*Htr2c*) dans l'hypothalamus montre un niveau d'expression élevé. De plus, par hybridation in situ on observe l'expression de *Htr2c* dans le VMH et le noyau arqué de l'hypothalamus. Ces résultats ont conduit à la réalisation de souris déficientes en récepteur de la sérotonine (*Htr2c*<sup>-/-</sup>) dont l'analyse du phénotype osseux a montré, une masse osseuse basse liée à une augmentation de la résorption et une diminution de la formation osseuse. Ces souris présentent un tonus sympathique élevé et une hyperphagie. Les souris double hétérozygotes (*Tph2*<sup>+/-</sup> ; *Htr2c*<sup>+/-</sup>) reproduisent le phénotype et démontre donc génétiquement que *Tph2* et *Htr2c* sont dans la même cascade pour le contrôle de la masse osseuse.

Enfin, la délétion spécifique des neurones exprimant le récepteur de la sérotonine dans le VMH (*LoxTB-Htr2c* ; *SF1-Cre*) est responsable du phénotype de masse osseuse basse.

### CONCLUSION INTERMEDIAIRE

La sérotonine cérébrale agit via son récepteur *Htr2c* sur les neurones présents dans le noyau VMH de l'hypothalamus pour baisser le tonus sympathique et favoriser la masse osseuse.

## 6) Connexion leptine et sérotonine cérébrale

Plusieurs expériences ont permis de démontrer que les neurones sérotoninergiques expriment le récepteur de la leptine *ObRb*. Parmi celles-ci, on retient que l'injection de leptine en intracérébroventriculaire à des souris sauvages, entraîne la diminution d'expression de *Tph2* dans le raphé et que les souris déficientes en leptine chez qui on délète en plus un allèle de *Tph2* (*Ob/Ob ; Tph2<sup>+/-</sup>*) ont une normalisation de leur sérotonine cérébrale, de leur phénotype osseux et de leur tonus sympathique. L'activité neuronale (potentiel d'action) de ces souris a également été analysée.

### CONCLUSION OSSEUSE

La leptine sécrétée par le tissu adipeux inhibe la formation osseuse, via un tonus sympathique élevé, en bloquant l'action positive des neurones sérotoninergiques du tronc cérébral (raphé) qui projettent leurs axones sur le noyau VMH de l'hypothalamus contrôlant le tonus sympathique.

## 7) Régulation de l'appétit et du métabolisme énergétique

Comme la démonstration précédente a permis d'établir le lien osseux entre la leptine et la sérotonine, la deuxième question posée par l'article est de savoir si la régulation de l'appétit par la leptine se fait par l'intermédiaire de la sérotonine puisque nous avons vu en préambule que, comme pour l'os, la régulation de l'appétit était altérée en cas de destruction chimique du noyau arqué de l'hypothalamus mais pas lorsque le récepteur de la leptine était spécifiquement délété dans le noyau arqué.

La sérotonine était là encore un bon candidat puisque les souris *Tph2<sup>-/-</sup>* ont outre leur phénotype osseux une diminution de l'appétit, une faible graisse viscérale et une dépense énergétique élevée. Un des éléments de la démonstration est l'obtention de souris déficientes en récepteur de la leptine spécifiquement dans le tronc cérébral (*ObRb<sup>fl/fl</sup> ; Sert-Cre*) qui récapitule le phénotype des souris *ob/ob* dont le phénotype est non seulement marqué par une masse osseuse élevée et un tonus sympathique bas mais aussi par une hyperphagie, une obésité et une faible dépense énergétique. Ces souris ont une sérotonine cérébrale élevée.

### CONCLUSIONS

- 1) La leptine agit dans le tronc cérébral en freinant les neurones sérotoninergiques qui projettent sur l'hypothalamus pour contrôler la masse osseuse (noyau VMH) et l'appétit (noyau arqué).
- 2) La sérotonine cérébrale
  - abaisse le tonus sympathique et donc stimule la masse osseuse ;
  - stimule l'appétit (orexigénique) et diminue la dépense énergétique.
- 3) La leptine :
  - augmente le tonus sympathique et donc freine la masse osseuse ;
  - freine l'appétit (anorexigénique) et stimule la dépense énergétique.

#### **IV- Matériels et méthodes : technique d'histomorphométrie vertébrale chez la souris**

Dans cette étude sur la régulation de la masse osseuse par la sérotonine cérébrale, mon travail a consisté en une participation active à la réalisation et l'analyse de l'histomorphométrie osseuse des différentes lignées de souris transgéniques obtenues. Le protocole d'histomorphométrie osseuse utilisé pour cette étude sur la sérotonine est présenté ci-dessous.

##### **1) Sacrifice des animaux, collecte des tissus et fixation**

A la date prévue par le protocole, les animaux d'un même groupe sont mis à jeun pendant 4 heures, pesés puis sacrifiés simultanément.

S'il y a lieu, la prise de sang est réalisée par voie intracardiaque ou par voie orbitaire. Le sang recueilli dans un tube Eppendorf® est laissé à température ambiante pendant cinq minutes puis mis dans la glace. À l'issue de la dissection de l'ensemble des animaux, les tubes sont centrifugés à 4°C pendant 15 minutes à pleine puissance. Le sérum obtenu est aliquoté et congelé à -80°C.

Lors de la dissection, les tissus mous sont prélevés. Suivant les expériences, on collectera une biopsie de foie, de muscle strié, de tissu adipeux, de graisse brune (localisation interscapulaire chez la souris), de pancréas et de tissu cérébral. Pour chaque tissu, un fragment est fixé dans le paraformaldéhyde fraîchement préparé à 4% et un autre fragment est placé dans un tube Eppendorf® et immédiatement congelé dans l'azote liquide en vue d'une extraction d'ARNm ultérieure. Enfin un morceau de queue (quelques millimètres) est mis dans un tube Eppendorf® pour digestion et vérification du génotype. Le tissu adipeux péri-gonadique (fat-pad) est consciencieusement disséqué et pesé, avant congélation, sur une balance à haute précision pour obtenir l'index d'adiposité de l'animal ou « *fat-pad ratio* » qui correspond à la mesure du fat-pad (g) sur le poids total de l'animal (g).

Une fois les tissus mous et le sang recueillis, l'animal est décapité et dépecé. Les tissus mous sont réséqués à l'exception des muscles appendiculaires et paravertébraux qui doivent être conservés pour une bonne orientation des vertèbres. L'animal est ensuite étendu sur un support polystyrène sur le dos et épinglé les membres en extension à 120°. On veillera à maintenir une bonne rectitude du rachis lors de l'installation sur le support. La base de la queue est également épinglée pour éviter toute rotation de la colonne. Le support est ensuite plongé dans le paraformaldéhyde frais à 4% pendant 12 heures à 4°C avec une agitation lente continue.

## **2) Déshydratation et dissection vertébrale**

Le lendemain, la solution de fixation est jetée. Les animaux restent sur le support. Le support est lavé à l'eau du robinet à deux reprises pour éliminer parfaitement la solution de fixation. Le support est ensuite plongé dans une solution d'éthanol à 70 % pendant 12 heures au minimum sous agitation continue lente à 4°C.

Après ce premier bain d'alcool, les vertèbres sont préparées en raclant délicatement au scalpel les muscles de la face antérieure des vertèbres jusqu'aux corps vertébraux. Ensuite la colonne est sectionnée au scalpel perpendiculairement à la colonne vertébrale en haut entre T12 et L1 et en bas entre L5 et S1 (on garde le sommet des crêtes iliaques pour l'orientation ultérieure). On obtient alors un bloc vertébral lombaire triangulaire qui est placé dans les cassettes d'histologie.

La déshydratation est poursuivie par des bains successifs de 12 à 24 heures à 4°C sous agitation continue lente : éthanol à 80 %, puis éthanol à 96 %, et enfin éthanol à 100 % à deux reprises.

## **3) Infiltration du tissu osseux à froid en méthyle méthacrylate**

Le méthyle méthacrylate est recueilli dans un bécher après son passage sur une colonne d'oxyde d'aluminium puis est catalysé par l'addition sous agitateur (barreau aimanté pendant 10 mn) de NPG (nonylphenyl-polyethylene glycol acetate, Fluka 74432) et de BPO conservé au sec à 37°C. Les cassettes d'histologie sont placées dans cette solution d'inclusion 1 pendant au moins 24 heures à 4°C. Ensuite ce bain d'inclusion est renouvelé une fois avec une solution fraîchement préparée.

## **4) Inclusion du tissu osseux à froid en méthyle méthacrylate**

La solution de méthyle méthacrylate catalysée est préparée selon la même procédure que la solution d'infiltration. Elle est ensuite activée par du DMPT (N,N-diméthyl-p-toluidine, Sigma D189006) sous agitateur à basse vitesse pendant 25 minutes. Une fois la solution ambrée obtenue, elle est versée dans des flacons en verre de 12 ml (Fisher 03 339 27D). Chaque bloc vertébral est délicatement déposé au fond d'un flacon de verre la face antérieure regardant le fond. On veillera à l'absence de bulle. Ensuite chaque flacon est fermé hermétiquement et placé au bain-marie à 4°C pendant 48 heures. La réaction de polymérisation du méthyle méthacrylate est exothermique.

Au bout de 48 heures, les blocs sont suffisamment durs. Les flacons de verre sont cassés au marteau. Les blocs sont prêts à être sectionnés. Dans l'attente, ils sont conservés à l'abri de la lumière à 4°C (pour ne pas altérer fluorescéine et activité TRAP).

**Solution de fixation (paraformaldéhyde à 4%)**

Solution toxique à préparer avec des gants sous la hotte aspirante  
Faire chauffer 1 litre de PBS 1X à 55°C au micro-onde  
Ajouter 40 g de PFA en poudre et dissoudre sous agitation  
Corriger le PH à 8.0 avec du NaOH  
Filtrer sous aspiration  
Refroidir à 4°C

**Solution d'infiltration de méthyle méthacrylate**

Solution toxique à préparer avec des gants sous la hotte aspirante  
MMA activé 100 mL  
NPG 14 mL  
BPO sec 0.33 g

**Solution d'inclusion de méthyle méthacrylate**

Solution toxique à préparer avec des gants sous la hotte  
MMA activé 100 mL  
NPG 14 mL  
BPO sec 0.55 g  
DMPT 500 microL

**5) Préparation et section des blocs**

Les blocs circulaires sont meulés sous forme triangulaire pour obtenir une flèche (L1 du côté de la tête de la flèche) afin de réduire la surface de friction lors de l'entame du bloc et faciliter leur section.

Les blocs sont coupés avec un microtome lourd utilisant une lame en carbure de tungstène (Carbide TC-65). L'approche est réalisée avec une épaisseur de coupe de 15 µm en utilisant de la solution de coupe. Durant cette période d'approche, l'objectif est d'orienter le bloc pour atteindre le plan qui permettra la section simultanée de L4 et L3. On repérera notamment la bonne position des « bras » des vertèbres. Ceci nécessite un ajustement dans le plan antéro-postérieur et dans le plan latéro-latéral.

Une fois le plan de coupe atteint, les coupes suivantes sont recueillies dans un ordre précis :

- trois coupes (n°1 à 3) de 7 µm
- puis quatre coupes de 4 à 5 µm (n°4 à 7)
- et enfin trois coupes de 7 µm (n°8 à 10)

Chaque coupe est placée sur une lame jusqu'au stretching.

Solution de coupe : éthanol à 70% 10mL  
ddH<sub>2</sub>O 90 mL  
savon liquide 8 à 10 gouttes

## 6) Stretching et montage des lames

Des gouttes de solution de stretching sont déposées sur chaque coupe à 2 reprises à 3mn d'intervalle. Une troisième série permet de positionner délicatement avec un pinceau la section vertébrale sur la lame et de la couvrir d'un plastique en chassant les bulles.

Les lames sont superposées les unes sur les autres et mises sous presse en étuve sèche à 55°C pendant 12 heures (48h à 37°C).

Solution de stretching :     éthanol à 70% 50mL  
                                      butyl glycol    50 mL

Butyl glycol =éthylène glycol buthyl éther (Sigma 537551-1LA).

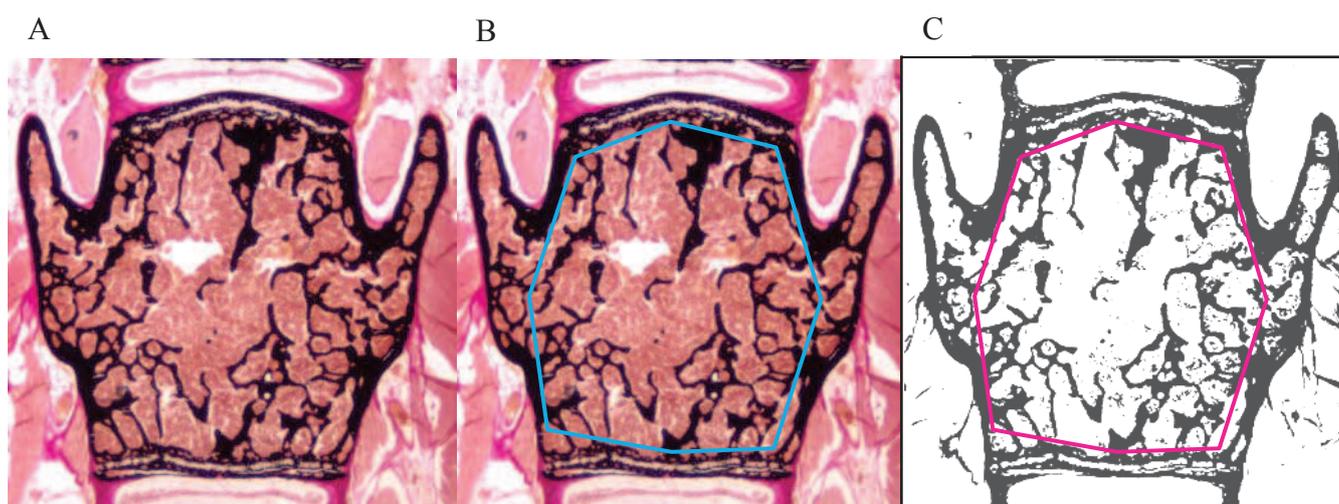
## 7) Coloration des lames et analyse histologique

L'analyse histologique est réalisée sur les vertèbres L3 et L4.

**Les lames #2 et #9** (7 µm) sont colorées selon Von Kossa/Van Gieson et permettront l'analyse de la masse osseuse (BV/TV) sous microscope optique au grossissement x20 couplé au logiciel analyseur d'image Osteomeasure®. Le seuillage utilisé est 80% après définition de la zone d'intérêt qui exclut les corticales et la plaque de croissance. Figure 4.

**Figure 4:** analyse histomorphométrique de la vertèbre L3. Coupe de 7 µm après coloration Von Kossa/Van Gieson. Microscope optique. Grossissement x20.

Image native (A), définition de la région d'intérêt (B), seuillage pour calcul du BV/TV (C).



**La lame #6** (4/5 microns) est colorée au bleu de toluidine pour permettre le compte des ostéoblastes. L'analyse est réalisée au microscope optique au grossissement x40 (filtre #2) à l'aide du logiciel Osteomeasure® sur 15 champs contigus d'os trabéculaire pour L3 et L4. Dans un premier temps, la surface ostéoblastique (ObS) est dessinée puis les ostéoblastes sont pointés un par un (N Ob) et enfin le périmètre osseux et la surface osseuse totale (BS) sont dessinés. Le logiciel produit deux valeurs : ObS/BS et N Ob/ B.Pm qui expriment l'ostéof ormation de l'animal. Un ostéoblaste est défini comme une cellule cuboïde, mononucléée colorée en bleu à la surface de l'os.

**La lame #4** (4/5 microns) est colorée au TRAP pour permettre le compte des ostéoclastes. L'analyse est réalisée au microscope optique au grossissement x40 (filtre #2) à l'aide du logiciel Osteomeasure® sur 15 champs contigus d'os trabéculaire pour L3 et L4. Dans un premier temps, la surface de résorption (OcS) est dessinée puis les ostéoclastes sont pointés un par un (N Oc) et enfin le périmètre osseux et la surface osseuse totale (BS) sont dessinés. Le logiciel produit deux valeurs : OcS/BS et N Oc/ B.Pm qui expriment l'ostéorésorption de l'animal. Un ostéoclaste est défini comme une cellule multinucléée, colorée en rouge à la surface de l'os.

**La lame #5** (4/5 microns) n'est pas colorée mais montée directement entre lame et lamelles (lavage 1mn dans le xylène puis montage de la lamelle avec de la colle DPX) pour être analysée sous microscope à fluorescence (filtre #3). Pour cette analyse, les animaux auront été injectés avant le sacrifice à 2 reprises à 48h d'intervalle avec de la calcéine. L'analyse est réalisée au grossissement x40 à l'aide du logiciel Osteomeasure® sur 15 champs contigus d'os trabéculaire pour L3 et L4. Dans un premier temps, les double-marquages fluorescents sont dessinés ainsi que la surface osseuse totale (BS). Ensuite le logiciel produit des valeurs d'histomorphométrie dynamique concernant la vitesse de formation et de la minéralisation osseuse:

- BFR/BS,
- BFR/BV,
- BFR/TV,
- et MAR.

## Coloration de Von Kossa/ Van Gieson

### *Préparation des colorants*

#### Nitrate d'argent

AgNO<sub>3</sub> (Sigma S 0139 25g) 1% dans eau distillée.  
Conservation à 4°C.

#### Sodium formamide

Carbonate de Sodium 12.5g (Sigma 2127).  
Eau distillée 187 ml. Mélanger.  
Ajout de formaldéhyde 37% : 62.5 mL.  
Conservation à 4°C.

#### Sodium thiosulfate

Sodium thiosulfate 5% (Sigma 1648) dans eau distillée.  
Conservation à 4°C.

#### Von Gieson

Fuchsin S 2.5g (Fluka 84600).  
Acide nitrique 70% 5 ml (Sigma 22571-1).  
Glycérine 100 mL (Sigma G 7893 = glycérol).  
Solution d'acide picrique saturé 900 mL (Sigma 925-40).  
Conservation à température ambiante.

### *Procédure*

AME 30mn

#### Hydratation

Ethanol 100%	2 mn
Ethanol 100%	2 mn
Ethanol 96%	2 mn
Ethanol 80%	2 mn
Ethanol 70%	2 mn
Ethanol 50%	2 mn
H <sub>2</sub> O déminéralisée	2 mn
H <sub>2</sub> O déminéralisée	2 mn

#### Colorations

Nitrate d'argent	5 mn
H <sub>2</sub> O déminéralisée	10 mn
Sodium formamide	5 mn
Eau du robinet (débit)	10 mn
Sodium thiosulfate	5 mn
Eau du robinet (débit)	10 mn
Van Gieson	3 à 7mn
Eau du robinet	bref plongeon

**Déshydratation**

Ethanol 50%	1 plongeon
Ethanol 70%	3 plongeurs
Ethanol 80%	3 plongeurs
Ethanol 96%	3 plongeurs
Ethanol 100%	2 mn
Ethanol 100%	2 mn
Xylène	3 mn
Xylène	3 mn
Xylène	3 mn

Montage avec colle DPX (2 gouttes sous lamelle)

**Coloration au bleu de toluidine***Préparation du colorant*

Bleu de toluidine (Sigma T 3260). Solution à 4% réalisée avec de l'eau distillée puis ajustée à PH 4.5 avec de HCl 0.1%. Conservation à 4°C.

*Procédure*

Hydratation (cf ci-dessus)

**Coloration**

Bleu de toluidine	20 à 60 secondes
Rinçage eau distillée	1 plongeon

Déshydratation et montage avec colle DPX

**Coloration TRAP**

Les ostéoclastes sont révélés par coloration TRAP conformément au protocole du kit Leucognost® SP4. Les coupes sont ensuite contre-colorées dans de l'hémalun Mayer® pendant 90 secondes puis rincées à l'eau du robinet. Le montage des coupes entre lame et lamelle est un montage aqueux avec la colle Aquatex®.

**Double marquage à la calcéine***Préparation*

Mélanger de la calcéine (Sigma C-0875) avec du PBS stérile 1X à la dose de 2.5mg/mL. Solution à garder à 4°C pendant 2 à 3 jours maximum à l'abri de la lumière. Faire au moins 10 mL.

*Procédure*

Injection de 200 µL par souris (20-25g de masse totale) à J1 et J4. Sacrifice à J6.

**V- Article** <sup>42</sup>

**A serotonin-dependent mechanism explains  
the leptin regulation of bone mass, appetite  
and energy expenditure.**

Yadav VK, Oury F, Suda N, Liu ZW, Gao XB, **Confavreux CB**, Klemenhagen KC, Tanaka KF, Gingrich JA, Guo XE, Tecott LH, Mann JJ, Hen R, Horvath TL, Karsenty G.

*Cell* 2009 Sep; 138(5): 976-89.

# A Serotonin-Dependent Mechanism Explains the Leptin Regulation of Bone Mass, Appetite, and Energy Expenditure

Vijay K. Yadav,<sup>1,9</sup> Franck Oury,<sup>1,9</sup> Nina Suda,<sup>1</sup> Zhong-Wu Liu,<sup>2</sup> Xiao-Bing Gao,<sup>2</sup> Cyrille Confavreux,<sup>1</sup> Kristen C. Klemenhagen,<sup>3</sup> Kenji F. Tanaka,<sup>3,4</sup> Jay A. Gingrich,<sup>5</sup> X. Edward Guo,<sup>6</sup> Laurence H. Tecott,<sup>7</sup> J. John Mann,<sup>8</sup> Rene Hen,<sup>3</sup> Tamas L. Horvath,<sup>2</sup> and Gerard Karsenty<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Genetics and Development, Columbia University, New York, NY 10032, USA

<sup>2</sup>Section of Comparative Medicine, Yale University School of Medicine, New Haven, CT 06510, USA

<sup>3</sup>Department of Pharmacology, Columbia University, New York, NY 10032, USA

<sup>4</sup>National Institute for Physiological Sciences, Okazaki 444-8585, Japan

<sup>5</sup>Department of Psychiatry-Developmental Psychobiology, Columbia University, New York, NY 10032, USA

<sup>6</sup>Bone Bioengineering Laboratory, Department of Biomedical Engineering, Columbia University, New York, NY 10027, USA

<sup>7</sup>Department of Psychiatry, University of California, San Francisco, CA 94158, USA

<sup>8</sup>Department of Psychiatry, Columbia University, New York, NY 10032, USA

<sup>9</sup>These authors contributed equally to this work

\*Correspondence: gk2172@columbia.edu

DOI 10.1016/j.cell.2009.06.051

## SUMMARY

**Leptin inhibition of bone mass accrual requires the integrity of specific hypothalamic neurons but not expression of its receptor on these neurons. The same is true for its regulation of appetite and energy expenditure. This suggests that leptin acts elsewhere in the brain to achieve these three functions. We show here that brainstem-derived serotonin (BDS) favors bone mass accrual following its binding to Htr2c receptors on ventromedial hypothalamic neurons and appetite via Htr1a and 2b receptors on arcuate neurons. Leptin inhibits these functions and increases energy expenditure because it reduces serotonin synthesis and firing of serotonergic neurons. Accordingly, while abrogating BDS synthesis corrects the bone, appetite and energy expenditure phenotypes caused by leptin deficiency, inactivation of the leptin receptor in serotonergic neurons recapitulates them fully. This study modifies the map of leptin signaling in the brain and identifies a molecular basis for the common regulation of bone and energy metabolisms.**

For a video summary of this article, see the PaperFlick file with the Supplemental Data available online.

## INTRODUCTION

Leptin is an adipocyte-derived hormone that regulates a broad spectrum of homeostatic functions following its binding to the signaling form of its receptor, ObRb, present on neurons of the central nervous system (Friedman and Halaas, 1998; Spiegel-

man and Flier, 2001). It is widely assumed that the hypothalamus, where *ObRb* is expressed in several nuclei, is the main site where leptin acts in the brain (Elmquist, 2000).

One homeostatic function regulated by leptin in rodents, sheep and humans is bone remodeling, the mechanism whereby vertebrates renew their bones during adulthood (Karsenty, 2006; Pogoda et al., 2006). Leptin regulates, only through a central relay, both phases of this process, resorption and formation (Ducy et al., 2000; Shi et al., 2008). One mediator linking leptin signaling in the brain to bone remodeling is the sympathetic tone which inhibits bone formation and favors bone resorption through the  $\beta 2$  adrenergic receptor (*Adr* $\beta 2$ ) expressed in osteoblasts (Eleftheriou et al., 2005; Takeda et al., 2002). Hence, sympathetic activity can be used as a readout of leptin regulation of bone mass.

The leptin-dependent central control of bone mass raises the question of the identity of the neurons mediating it. Chemical lesioning experiments performed in both WT and leptin-deficient (*ob/ob*) mice followed by leptin intracerebroventricular (ICV) infusion provided compelling evidence that, to regulate bone mass, leptin requires the integrity of neurons of the ventromedial hypothalamic (VMH) nuclei which in turn influence sympathetic activity (Takeda et al., 2002). Surprisingly however, VMH-specific deletion of *ObRb* does not affect bone mass (Balthasar et al., 2004). At least two interpretations of these experiments can be proposed. The first one is that they are contradicting each other and that, since chemical lesioning is less precise than cell-specific gene deletion, results obtained using the former technique are not reliable (Waddington et al., 2007). A second, more literal, interpretation views these two experiments as complementary and simply states that VMH neurons are necessary for leptin to regulate bone mass but signaling through ObRb on these neurons is not.

This latter interpretation gains further support if one looks at another function regulated centrally by leptin: appetite. Genetic

inactivation of *ObRb* in all neurons and chemical destruction of the arcuate nuclei of hypothalamus increases appetite (Cohen et al., 2001), yet inactivation of *ObRb* selectively in arcuate, VMH or in both nuclei does not when mice are fed a normal diet (Balthasar et al., 2004). This inconsistency echoes the one noted above for the regulation of bone mass. Together they raise the prospect that leptin may first act elsewhere in the brain to affect synthesis of neuromediator(s) that in turn influences bone mass and energy metabolism by signaling to hypothalamic neurons.

Serotonin is an indoleamine produced in enterochromaffin cells of the duodenum and in serotonergic neurons of brainstem that does not cross the blood brain barrier (Mann et al., 1992). Thus, it is de facto a molecule with two distinct functional identities depending on its site of synthesis: a hormone when made in the gut and a neurotransmitter when made in the brain (Walther et al., 2003; Yadav et al., 2008). Although brain-derived serotonin (BDS) has many known roles (Heath and Hen, 1995) its potential function as a regulator of bone mass accrual or other homeostatic processes has not been thoroughly examined yet. This is an important question to address for several reasons. First, the critical role exerted by gut-derived serotonin on bone formation (Yadav et al., 2008) raises questions regarding the role BDS may have in this process. Additionally, in invertebrates where it has been tested genetically, serotonin strongly enhances appetite (Horvitz et al., 1982; Srinivasan et al., 2008).

Here we show that, unlike leptin, BDS favors bone mass accrual and appetite, and decreases energy expenditure following its binding to distinct receptors located on two different hypothalamic nuclei. Cell-specific gene deletion of the leptin receptor show that leptin regulation of these functions occurs by inhibiting serotonin synthesis in neurons of the brainstem. These results reveal a different map of leptin action in the brain, expand the importance of BDS in physiology, they also identify a molecular basis for the common central control of bone mass and appetite.

## RESULTS

### Low Bone Mass in Mice Deprived of Serotonin in the Brain

Serotonin synthesis is initiated by hydroxylation of tryptophan, a rate-limiting reaction performed by the enzyme tryptophan hydroxylase 2 (*Tph2*) in the brain (Walther et al., 2003). To determine whether BDS affects bone mass we disrupted *Tph2* by inserting *LacZ* in its locus (Figure S1A) and first used this allele to study *Tph2* pattern of expression.

The location of serotonergic neurons in the present study was defined according to Jensen et al. (Jensen et al., 2008) as follows: Dorsal raphe (B4, B6 and B7), median raphe (B5, B8 and B9) and caudal raphe (B1, B2 and B3) nuclei. Together these neurons will be referred thereafter as serotonergic neurons of the brainstem in this manuscript.  $\beta$ -galactosidase staining of the whole brain showed that during embryonic development *Tph2* expression was detected as early as E12.5 in neurons of the dorsal and median raphe nuclei in the brainstem (Figure 1A and data not shown). At E14.5, 15.5, and 18.5,  $\beta$ -galactosidase staining was also detected in neurons of the caudal raphe nuclei of the brainstem (Figures 1A and 1B) but not in other areas of the brain or in peripheral tissues (Figures S1B–S1D). To determine

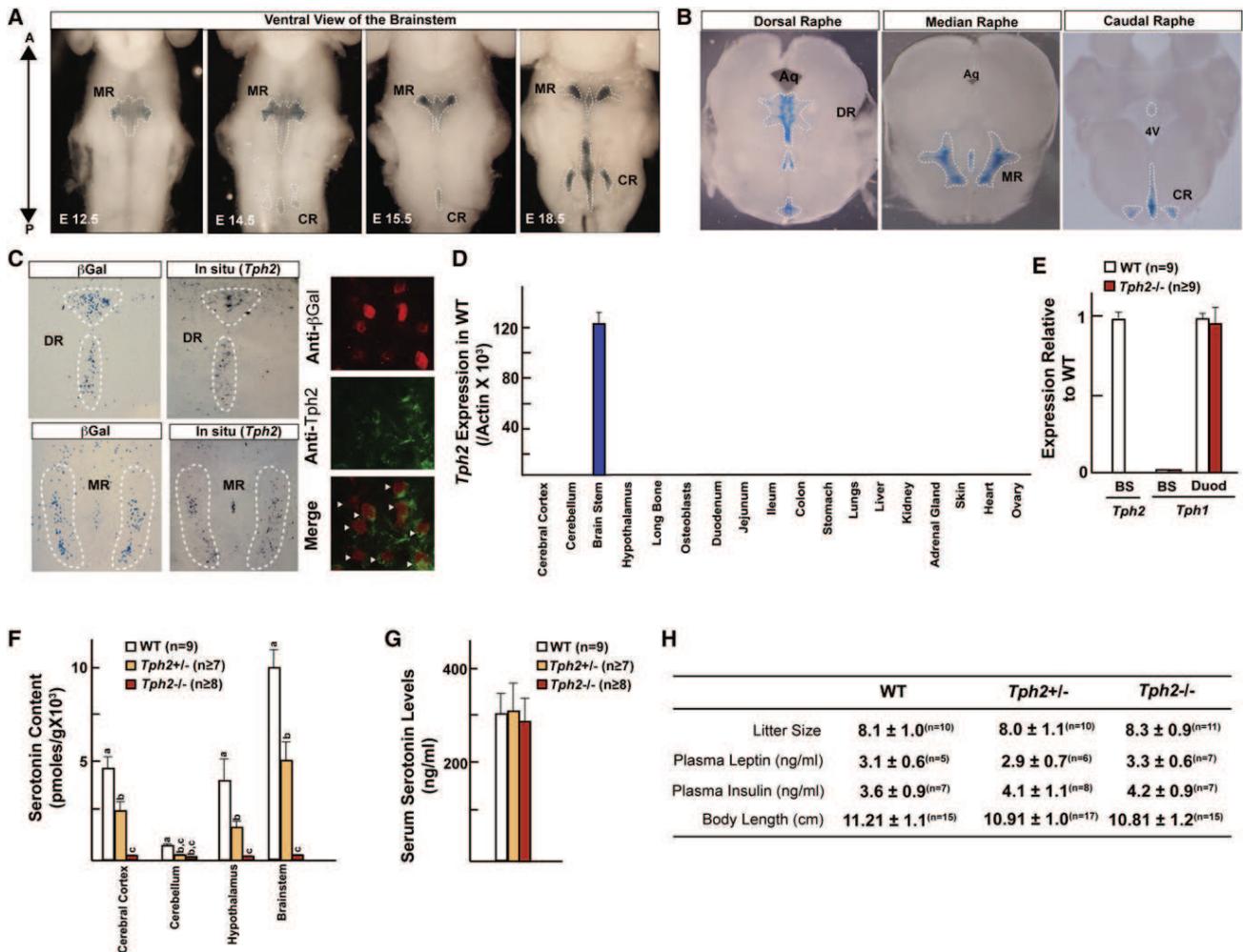
whether  $\beta$ -galactosidase staining is a faithful representation of *Tph2* endogenous expression we performed in situ hybridization and coimmunolocalization of *Tph2* and  $\beta$ -galactosidase. These experiments revealed a tight concordance between *Tph2* expression and  $\beta$ -galactosidase staining (Figure 1C). After birth, *Tph2* expression measured by real-time PCR was four orders of magnitude higher in the brainstem than in other parts of the brain or in peripheral tissues (Figure 1D). Based on these criteria, *Tph2* expression is specific to serotonergic neurons of the brainstem.

*Tph2*<sup>-/-</sup> mice were born at the expected Mendelian ratio, had a normal size and appearance and were normally fertile (Figure 1H and data not shown). The near complete absence of detectable serotonin in the brain of *Tph2*<sup>-/-</sup> mice verified that we had successfully inactivated this gene and was consistent with the fact that *Tph1* expression in the brain was not enhanced, at least post-natally, by the *Tph2* deletion (Figures 1E and 1F). Conversely, blood serotonin levels were normal in *Tph2*<sup>-/-</sup> mice (Figure 1G). Thus the *Tph2*<sup>-/-</sup> mouse is an animal model lacking serotonin selectively in the brain. Serum levels of leptin, insulin, corticosterone and T4 as well as body length were also normal in 3-month-old *Tph2*<sup>-/-</sup> animals (Figures 1H and S1E).

To assess the influence of BDS on bone remodeling histological, histomorphometric and microcomputed tomography ( $\mu$ CT) analyses of bones were performed in 4-, 6- and 12-week-old wild-type (WT) and *Tph2*<sup>-/-</sup> mice. The absence of serotonin in the brain resulted, at all time points, in a severe low bone mass phenotype affecting axial (vertebrae) and appendicular (long bones) skeleton while bone length and width were unaffected (Figures 2A–2D and data not shown). Three-month-old *Tph2*<sup>+/-</sup> mice also displayed a decrease in bone mass, albeit milder (Figure 2A). This phenotype was secondary to a decrease in bone formation parameters (osteoblast numbers and bone formation rate) and to an increase in bone resorption parameters (osteoclast surface and circulating levels of deoxypridinoline [Dpd], a degradation product of type I Collagen and a biomarker of bone resorption [Eyre et al., 1988]) (Figures 2A and 2E). Bone mineralization was normal in *Tph2*<sup>-/-</sup> mice (Figure S2). These results demonstrate that BDS is a positive and powerful regulator of bone mass accrual acting on both arms of bone remodeling. Since serotonin does not cross the blood brain barrier these observations provide a rare example of a regulation of bone mass by a neuromediator.

### The Influence of Brain-Derived Serotonin on Bone Mass Prevails over the One of Gut-Derived Serotonin

That serotonin exerts opposite influences on bone remodeling depending on its site of synthesis was unexpected. Since BDS accounts for only 5% of total serotonin we asked what was its actual contribution to the overall regulation of bone mass accrual by serotonin. To that end we generated mice unable to synthesize serotonin anywhere in their body by inactivating both *Tph1* and *Tph2* (Figures 3A and 3B). *Tph1*<sup>-/-</sup>;*Tph2*<sup>-/-</sup> mice were born at the expected Mendelian ratio and had normal size and life span (data not shown). To our surprise, like the *Tph2*<sup>-/-</sup> mice, *Tph1*<sup>-/-</sup>;*Tph2*<sup>-/-</sup> mice displayed a low bone mass secondary to a decrease in bone formation and to an increase in bone resorption parameters and affecting the axial and appendicular skeleton (Figure 3C and data not shown). By showing that



**Figure 1. Generation of *Tph2*<sup>-/-</sup> Mice**

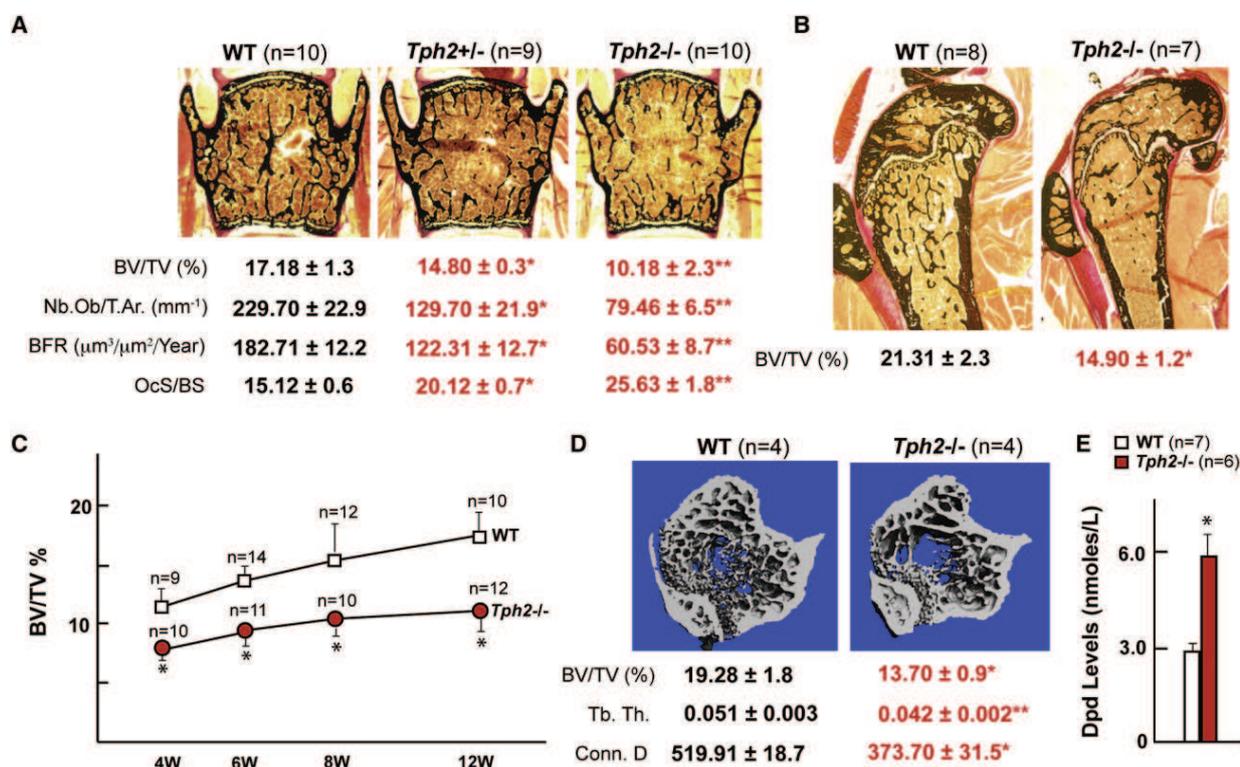
(A)  $\beta$ -Galactosidase staining in the mouse brain during embryonic (E12.5–18.5) development. A, anterior; P, posterior.  
 (B) Localization of *Tph2*-expressing neurons in the dorsal (DR; from Bregma  $-4.04$  to  $-5.49$ ), median (MR; from Bregma  $-4.04$  to  $-4.48$ ), and caudal raphe (CR; from Bregma  $-4.84$  to  $-7.48$ ) in coronal sections of a mouse brain.  
 (C) *Tph2* expression by in situ hybridization,  $\beta$ -galactosidase staining, and coimmunolocalization in *Tph2LacZ*<sup>+/+</sup> mice. Arrowheads indicate *Tph2*/ $\beta$ -Gal double positive cells.  
 (D) Real-time PCR (qPCR) analysis of *Tph2* expression in tissues of WT mice.  
 (E) qPCR analysis of *Tph2* expression in brainstem (BS) and duodenum (Duod) of WT and *Tph2*<sup>-/-</sup> mice.  
 (F) HPLC analysis of serotonin levels in different regions of brain in WT, *Tph2*<sup>+/-</sup> and *Tph2*<sup>-/-</sup> mice.  
 (G) Serum serotonin levels in WT, *Tph2*<sup>+/-</sup> and *Tph2*<sup>-/-</sup> mice.  
 (H) Mean litter size, serum biochemistry, and body length in WT, *Tph2*<sup>+/-</sup>, and *Tph2*<sup>-/-</sup> mice (n is indicated in superscript above each value).  
 For all panels (except [F]) \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$  (Student's t test). Error bars represent the SEM. For (F): one-way ANOVA, Newman-Keuls test; different letters on two or more bars indicate significant differences between the respective groups ( $p < 0.05$ ).

the influence of BDS on bone remodeling prevails over the one exerted by gut-derived serotonin even though it accounts for only 5% of the total pool of serotonin this experiment underscored the importance of BDS in the regulation of bone mass and was an incentive to elucidate its mode of action.

**Sympathetic Mediation of Brain-Derived Serotonin Regulation of Bone Mass**

The decrease in bone formation and the increase in bone resorption seen in *Tph2*<sup>-/-</sup> mice is the mirror image of what is observed

in mice lacking the  $\beta 2$  adrenergic receptor (*Adrb2*<sup>-/-</sup> mice) (Eleftheriou et al., 2005). This feature suggested that the bone phenotype of the mice lacking serotonin in the brain could be secondary to an increase in sympathetic signaling in osteoblasts. That norepinephrine content in the brain, epinephrine elimination in the urine and *Ucp1* expression in brown fat, three markers of the sympathetic tone, were all markedly increased in *Tph2*<sup>+/-</sup>, *Tph2*<sup>-/-</sup>, and *Tph1*<sup>-/-</sup>; *Tph2*<sup>-/-</sup> mice at 6 and 12 weeks of age supported this hypothesis (Figures 3D–3F and S3). We also generated *Tph2*<sup>-/-</sup> mice in which one allele of *Adrb2* had



**Figure 2. Low Bone Mass in *Tph2*<sup>-/-</sup> Mice**

(A and B) Histological analysis of vertebrae (A) and long bones (B) of WT, *Tph2*<sup>+/-</sup>, and *Tph2*<sup>-/-</sup> mice. Mineralized bone matrix is stained in black by von Kossa reagent. Histomorphometric parameters. BV/TV%, bone volume over trabecular volume; Nb.Ob/T.Ar., number of osteoblasts per trabecular area; BFR, bone formation rate; OcS/BS, osteoclast surface per bone surface.

(C) BV/TV% analysis in WT and *Tph2*<sup>-/-</sup> mice at 4, 6, 8, and 12 weeks after birth.

(D) Lower bone density in long bones of 12-week-old *Tph2*<sup>-/-</sup> mice by  $\mu$ CT analysis along with lower Tb. Th (trabecular thickness) and decreased connectivity density (Conn.D).

(E) Serum Dpd levels in WT and *Tph2*<sup>-/-</sup> mice.

For all panels: \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ . Error bars represent the SEM.

been inactivated (Figures 3F and 3G). We removed one copy of this gene because *Adrb2* is the only adrenergic receptor expressed in osteoblasts (Takeda et al., 2002). *Tph2*<sup>-/-</sup>; *Adrb2*<sup>+/-</sup> mice had normal bone formation and bone resorption parameters and a normal bone mass, the same was true for *Tph2*<sup>-/-</sup>; *Adrb2*<sup>-/-</sup> mice (Figure 3G and data not shown). These results indicate that the regulation of bone mass accrual by BDS occurs by decreasing the sympathetic tone.

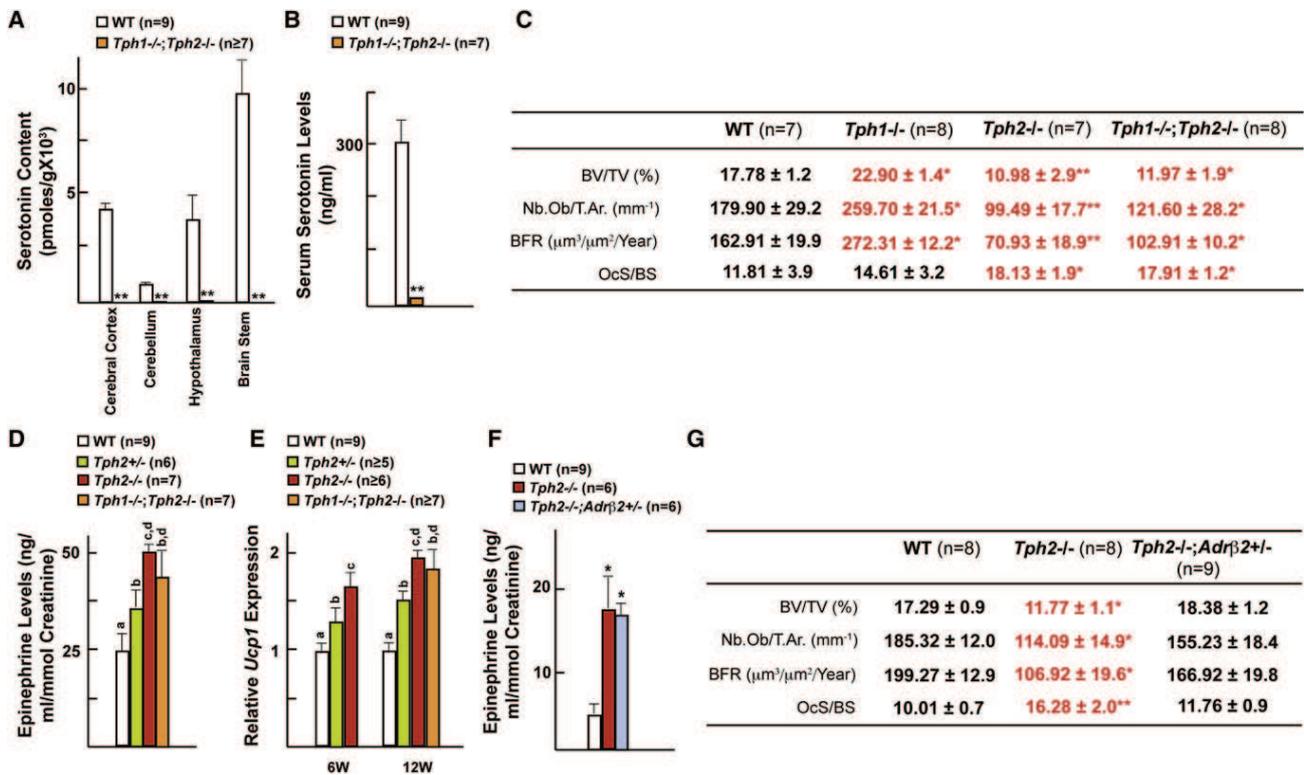
### Brain-Derived Serotonin Regulates Bone Mass through the Hypothalamus

Since the sympathetic regulation of bone mass requires the integrity of the VMH neurons of the hypothalamus (Takeda et al., 2002) we next asked whether the BDS regulation of bone mass also occurs through a VMH relay.

To search for anatomical connections between *Tph2*-expressing and hypothalamic neurons we used the *Rosa26R-Ecfp* mice (Srinivas et al., 2001). In this latter mouse model the *Ecfp* (Enhanced Cyan fluorescent protein) reporter gene containing a floxed transcriptional blocker cassette inserted between the transcription start site and the ATG is placed downstream of

the *Rosa26* promoter. Thus, *Ecfp* can only be expressed after Cre-mediated deletion of the transcriptional blocker. We crossed *Rosa26R-Ecfp* mice with *Sert-Cre* transgenic mice that express Cre only in *Tph2*-expressing neurons (Zhuang et al., 2005). *Ecfp* immunostaining in *Sert-Cre*; *Rosa26R-Ecfp* mice showed that axons emanating from *Tph2*-expressing neurons of the brainstem projected to the hypothalamus (Figure 4A) and in situ hybridization performed on adjacent sections demonstrated that those axonal projections reached *Sf1*-expressing VMH neurons (Figure 4A). These findings were confirmed by fluorescent dextran tracing. Anterograde and retrograde labeling in *Tph2*<sup>+/-</sup> mice showed that VMH neurons were targeted by neuronal projections emanating from *Tph2*-expressing neurons in the brainstem (Figures 4B, 4C, S4A, and S4B). This morphological data suggesting that serotonin signals in neurons of the VMH nuclei was an incentive to search for serotonin receptor(s) on these neurons.

Real-time PCR analysis revealed that among the 14 serotonin receptors *Htr2c* was by far the most highly expressed in the hypothalamus albeit it was not the only one (Figure 4D) and double fluorescent in situ hybridization experiments showed



**Figure 3. Brain-Derived Serotonin Inhibits Sympathetic Activity**

(A and B) HPLC analysis of serotonin levels in different regions of brain and serum serotonin levels in WT and *Tph1*<sup>-/-</sup>;*Tph2*<sup>-/-</sup> mice.

(C) Histomorphometric analysis of vertebrae of WT, *Tph1*<sup>-/-</sup>, *Tph2*<sup>-/-</sup>, and *Tph1*<sup>-/-</sup>;*Tph2*<sup>-/-</sup> mice.

(D) Epinephrine levels in WT, *Tph2*<sup>+/-</sup>, *Tph2*<sup>-/-</sup>, and *Tph1*<sup>-/-</sup>;*Tph2*<sup>-/-</sup> mice.

(E) qPCR analysis of *Ucp1* expression in brown adipose tissue of WT, *Tph2*<sup>+/-</sup>, *Tph2*<sup>-/-</sup>, and *Tph1*<sup>-/-</sup>;*Tph2*<sup>-/-</sup> mice.

(F) Epinephrine levels in the urine of WT, *Tph2*<sup>-/-</sup>, and *Tph2*<sup>-/-</sup>;*Adrb2*<sup>+/-</sup> mice.

(G) Histomorphometric analysis of vertebrae of WT, *Tph2*<sup>-/-</sup>, and *Tph2*<sup>-/-</sup>;*Adrb2*<sup>+/-</sup> mice.

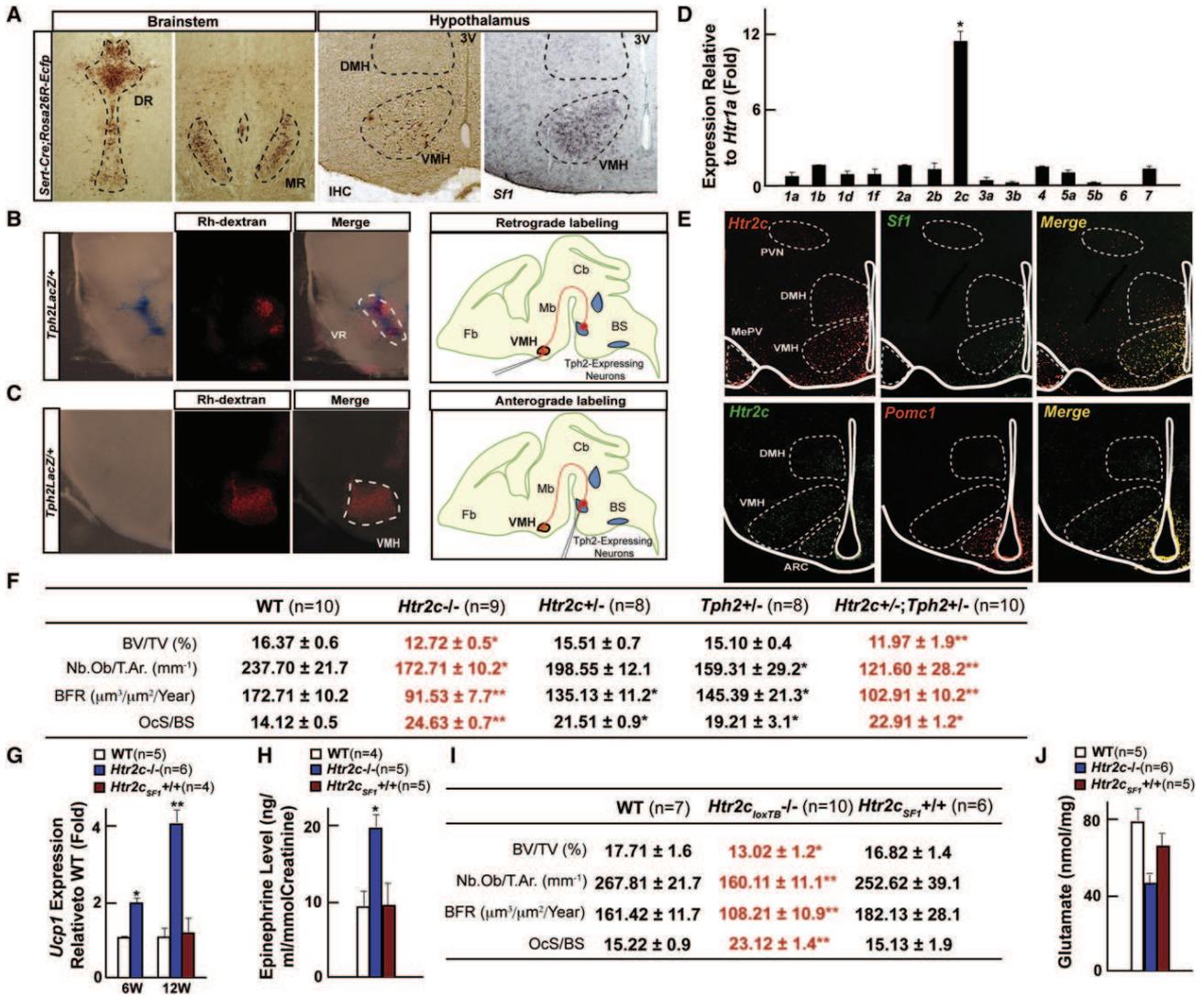
For all panels (except [D] and [E]): \* p < 0.05; \*\* p < 0.01 (Student's t test). Error bars represent SEM. For (D) and (E): one-way ANOVA, Newman-Keuls test. Different letters on two or more bars indicate significant differences between the respective groups (p < 0.05).

that *Htr2c* was expressed in *Sf1*-expressing VMH and in *Pomc*-expressing arcuate neurons (Pasqualetti et al., 1998) (Figures 4E and S4C). Moreover, *Ecfp*-positive neuronal arborizations originating from serotonergic neurons of the brainstem project preferentially to the anterior part of the VMH nucleus where *Htr2c* is expressed at its highest level (from Bregma -1.06 mm to -1.34 mm; Figure 4A, right panel). To determine the importance of serotonin signaling through *Htr2c* in the regulation of bone mass we first analyzed mice lacking *Htr2c* in all cells (*Htr2c*<sup>-/-</sup> mice). Since *Htr2c*<sup>-/-</sup> mice develop an increase in food intake and adiposity beyond 14 week of age (Tecott et al., 1995), we analyzed 6- and 12-week-old animals after verifying that at those ages appetite, energy expenditure, body weight, fat pad weights and hormonal profiles were identical in *Htr2c*<sup>-/-</sup> and WT mice (Figures S4D-S4H).

Histological analyses uncovered in both 6- and 12-week-old *Htr2c*<sup>-/-</sup> mice a severe low bone mass phenotype secondary to a decrease in the number of osteoblasts and bone formation rate, and to an increase in the number of osteoclasts and bone resorption parameters (Figure 4F and data not shown). Moreover, *Ucp1* expression in brown fat and urinary elimination of epineph-

rine were both significantly higher in *Htr2c*<sup>-/-</sup> mice revealing the existence of a high sympathetic activity (Figures 4G and 4H). Thus, both in terms of bone remodeling parameters and sympathetic tone, *Htr2c*<sup>-/-</sup> mice are a phenocopy of *Tph2*<sup>-/-</sup> mice at time points when no metabolic abnormalities could be found. To establish that it is by signaling through *Htr2c* that BDS regulates bone mass we generated compound mutant mice lacking one allele of *Tph2* and one allele of *Htr2c* (*Tph2*<sup>+/-</sup>;*Htr2c*<sup>+/-</sup> mice). These latter mutant mice presented at 6 and 12 weeks of age the same low bone mass/high sympathetic activity phenotype than the *Htr2c*<sup>-/-</sup> and *Tph2*<sup>-/-</sup> mice (Figure 4F and data not shown). These results support the notion that BDS utilizes the *Htr2c* receptor to regulate sympathetic tone and bone mass independently of the influence it exerts through this receptor on energy metabolism.

To determine whether it is through its expression in VMH neurons that *Htr2c* regulates bone mass we used mutant mice harboring a loxP-flanked transcriptional blocking (loxTB) cassette inserted in the *Htr2c* gene (loxTB *Htr2c* mice) (Xu et al., 2008). In these mice disruption of *Htr2c* transcription can be alleviated, in a cell population of choice, by the Cre



**Figure 4. Serotonin Promotes Bone Mass through Htr2c Receptors in VMH**

(A-C) Analysis of axonal projections emanating from the serotonergic neurons of the brainstem. Coronal sections through the Dorsal (DR), Median (MR) raphe and ventromedial hypothalamus (VMH) nuclei from *Sert-Cre;Rosa26REcfp* mice identifying serotonergic neurons and their axonal projections to VMH neurons through *Ecfp* immunohistochemistry (A). Retrograde (B) and anterograde (C) Rhodamine dextran labeling (Rh-dextran) in *Tph2LacZ/+* mice. Coronal sections through the brainstem and hypothalamus showing colocalization of  $\beta$ -galactosidase staining and Rh-dextran fluorescence.

(D) qPCR analysis of serotonin receptor expression in hypothalamus.

(E) Double fluorescence situ hybridization analysis of *Htr2c* expression with *Pomc* or *Sf1* expression in anterior (Top panel) and posterior (Bottom panel) VMH and arcuate nuclei. The third ventricle is outlined by a white line.

(F) Histomorphometric analysis of vertebrae of WT, *Htr2c*<sup>-/-</sup>, *Htr2c*<sup>+/-</sup>, *Tph2*<sup>+/-</sup> and *Htr2c*<sup>+/-</sup>;*Tph2*<sup>+/-</sup> mice.

(G and H) qPCR analysis of *Ucp1* expression in brown adipose tissue (G) and epinephrine levels in urine (H) in WT, *Htr2c*<sup>-/-</sup>, and *Htr2c*<sub>SF1</sub><sup>+/-</sup> mice.

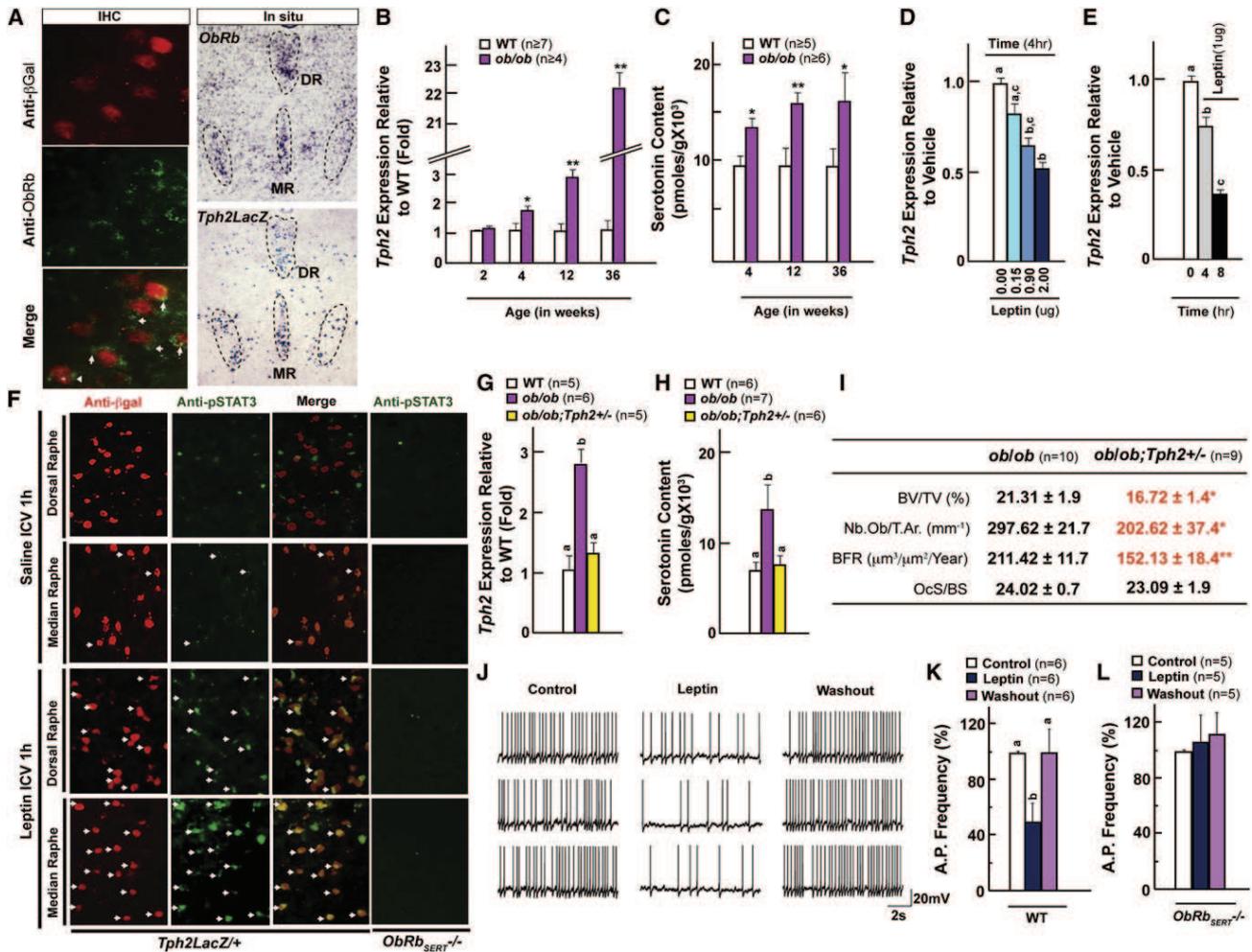
(I) Histomorphometric analysis of vertebrae of WT, *Htr2c*<sub>loxTB</sub><sup>-/-</sup> and *Htr2c*<sub>SF1</sub><sup>+/-</sup> mice.

(J) HPLC analysis of glutamate levels in hypothalamus of WT and *Htr2c*<sup>-/-</sup> mice.

For all panels (except [J]): \* p < 0.05; \*\* p < 0.01 (Student's t test). Error bars represent the SEM. For (J): one-way ANOVA, Newman-Keuls test; different letters on two or more bars indicate significant differences between the respective groups (p < 0.05).

recombinase. *Htr2c* re-expression was targeted to VMH neurons by crossing *loxTB Htr2c* mice with *Sf1-Cre* mice (Figure S4J). Histological analyses showed that re-expression of *Htr2c* receptor in VMH neurons (*Htr2c*<sub>SF1</sub><sup>+/-</sup> mice) rescued entirely the bone mass phenotype observed in the absence of *Htr2c* (Figures 4G-4I). Moreover, *Ucp1* expression in brown fat and

urinary elimination of epinephrine were also similar between WT and *Htr2c*<sub>SF1</sub><sup>+/-</sup> mice and levels of glutamate, an inhibitor of sympathetic tone that were suppressed in *Htr2c*<sup>-/-</sup> hypothalami were partially restored in *Htr2c*<sub>SF1</sub><sup>+/-</sup> hypothalami (Figures 4G, 4H, and 4J). These findings echo previous observations indicating that serotonin attenuates activation of noradrenergic



**Figure 5. Leptin Inhibits Bone Mass Accrual by Inhibiting Brain-Derived Serotonin Synthesis**

(A) In situ hybridization analysis and coimmunolocalization of *ObRb* expression in serotonergic neurons. (B and C) qPCR analysis of *Tph2* expression (B) and brainstem serotonin content (C) at different ages in WT and *ob/ob* female mice. (D and E) qPCR analysis of *Tph2* expression following intra-cerebroventricular (ICV) infusion of leptin at different doses (D) and at different time points (E) in WT mice. (F) Immunohistochemical analysis of STAT3 phosphorylation in the dorsal and median raphe following leptin ICV. Arrows indicate pSTAT3/β-Gal positive cells. (G and H) qPCR analysis of *Tph2* expression (G) and brainstem serotonin content (H) in WT, *ob/ob* and *ob/ob;Tph2+/-* mice. (I) Histomorphometric analysis of vertebrae of *ob/ob* and *ob/ob;Tph2+/-* mice. (J) Representative traces of action potentials recorded from WT mice before, during and after the application of leptin (100 nM). R.M.P.: -43.0 mV. (K and L) Analysis of serotonergic neuron action potential (AP) frequency in brainstem slices from WT (K) and *ObRb<sub>SERT</sub>-/-* (L) mice. For all panels (except [D], [E], [G], [H] and [K]): \* p < 0.05; \*\* p < 0.01 (Student's t test). Error bars represent the SEM. For (D), (E), (G), (H), and (K): one-way ANOVA, Newman-Keuls test; different letters on two or more bars indicate significant differences between the respective groups (p < 0.05).

neurons in the locus coeruleus (Aston-Jones et al., 1991). Taken together, the results presented so far indicate that BDS acts on VMH neurons, through *Htr2c*, to decrease sympathetic activity and thereby favors bone mass accrual.

**Leptin Inhibits Bone Mass Accrual by Decreasing Brain-Derived Serotonin Synthesis**

Although leptin and serotonin exert opposite influences on bone mass accrual, several features suggested that they might operate in the same pathway. For instance serotonin, like leptin, uses the sympathetic tone to regulate bone mass and, also

like leptin, it requires VMH neurons integrity to achieve this function. As shown below, multiple lines of evidence indicate that it is by inhibiting BDS synthesis that leptin prevents bone mass accrual.

First, *ObRb*, the signaling form of the leptin receptor, is expressed in β-galactosidase-positive *Tph2*-expressing neurons (Figure 5A). Second, *Tph2* expression increased steadily over time in *ob/ob* mice to eventually reach a level 10-fold higher than what is seen in WT mice at 9 months of age (Figure 5B) and conversely, serotonin content is significantly higher in the brainstem of *ob/ob* mice (Figure 5C). Third, leptin ICV

infusion decreased *Tph2* expression in a time- and dose-dependent manner in WT mice (Figures 5D and 5E). Fourth, coimmunolocalization studies revealed that the phosphorylation of Stat3, a transcription factor mediating leptin signaling, that was increased in  $\beta$ -galactosidase-positive serotonergic neurons of the brainstem following acute leptin ICV infusion in WT mice was dramatically reduced in *ObRb<sub>SERT</sub><sup>-/-</sup>* mice (Figure 5F). In support of these correlative arguments *ob/ob* mice lacking one allele of *Tph2* (*ob/ob;Tph2<sup>+/-</sup>* mice) displayed normal *Tph2* expression, normal serotonin content in the brainstem, normal sympathetic tone and normal bone remodeling parameters and bone mass (Figures 5G–5I, and S5). These data suggest a model whereby leptin regulates bone mass accrual through a double inhibitory loop. Leptin inhibits synthesis of BDS, which in turn reduces, by signaling in VMH neurons, the sympathetic tone; as a result leptin prevents bone mass accrual.

### Leptin Inhibits the Neuronal Activity of Serotonergic Neurons

The mediation of peripheral hormone action on the output of the brain relies on altered circuit activity. Interaction between neuronal circuits hinges on electric properties of neurons, particularly on the generation of action potentials. Thus to test whether leptin directly alters serotonin output from brainstem neurons, we analyzed the responses of serotonin-producing cells to leptin with whole cell patch clamp recording in brain slices containing dorsal raphe (DR) (Supplemental Experimental Procedures). Slices were taken from WT animals and from mice lacking *ObRb* selectively in *Tph2*-expressing neurons (*ObRb<sub>SERT</sub><sup>-/-</sup>* mice). Serotonergic neurons were identified according to their unique properties (long-duration action potential, activation by norepinephrine and inhibition by serotonin itself) (Liu et al., 2002). Since serotonergic neurons are usually quiescent in slices because of the loss of noradrenergic inputs, action potentials in these neurons were restored by application of alpha-1 adrenergic agonist phenylephrine (3  $\mu$ M) in the bath (Liu et al., 2002). Whole cell patch recording showed that leptin significantly decreased action potential frequency in serotonergic neurons of WT mice, but not in serotonergic neurons of mice lacking *ObRb* in *Tph2*-expressing neurons (*ObRb<sub>SERT</sub><sup>-/-</sup>* mice) (Figures 5J–5L). These data show that leptin can alter directly activity of serotonergic neurons in the brainstem and that this effect of leptin is mediated by *ObRb* expressed on these neurons.

### Brain-Derived Serotonin Regulates Appetite and Energy Expenditure

In addition to low bone mass, we consistently observed a significant decrease in fat pad weight in *Tph2<sup>-/-</sup>* mice (Figure 6A). This surprising observation led us to analyze in greater details energy metabolism in these mutant mice. At both 6 and 12 weeks of age there was a significant decrease in food intake in *Tph2<sup>-/-</sup>* (~31%) and *Tph2<sup>+/-</sup>* (~14%) mice compared to WT littermates along with an increase in energy expenditure (as measured by  $V_{O_2}$ , XTOT and Heat production) (Figures 6B–6E). In contrast glucose metabolism, serum levels of leptin and other hormones were not affected in *Tph2*-deficient mice (Figures 1H, S1E, S6A, and S6B).

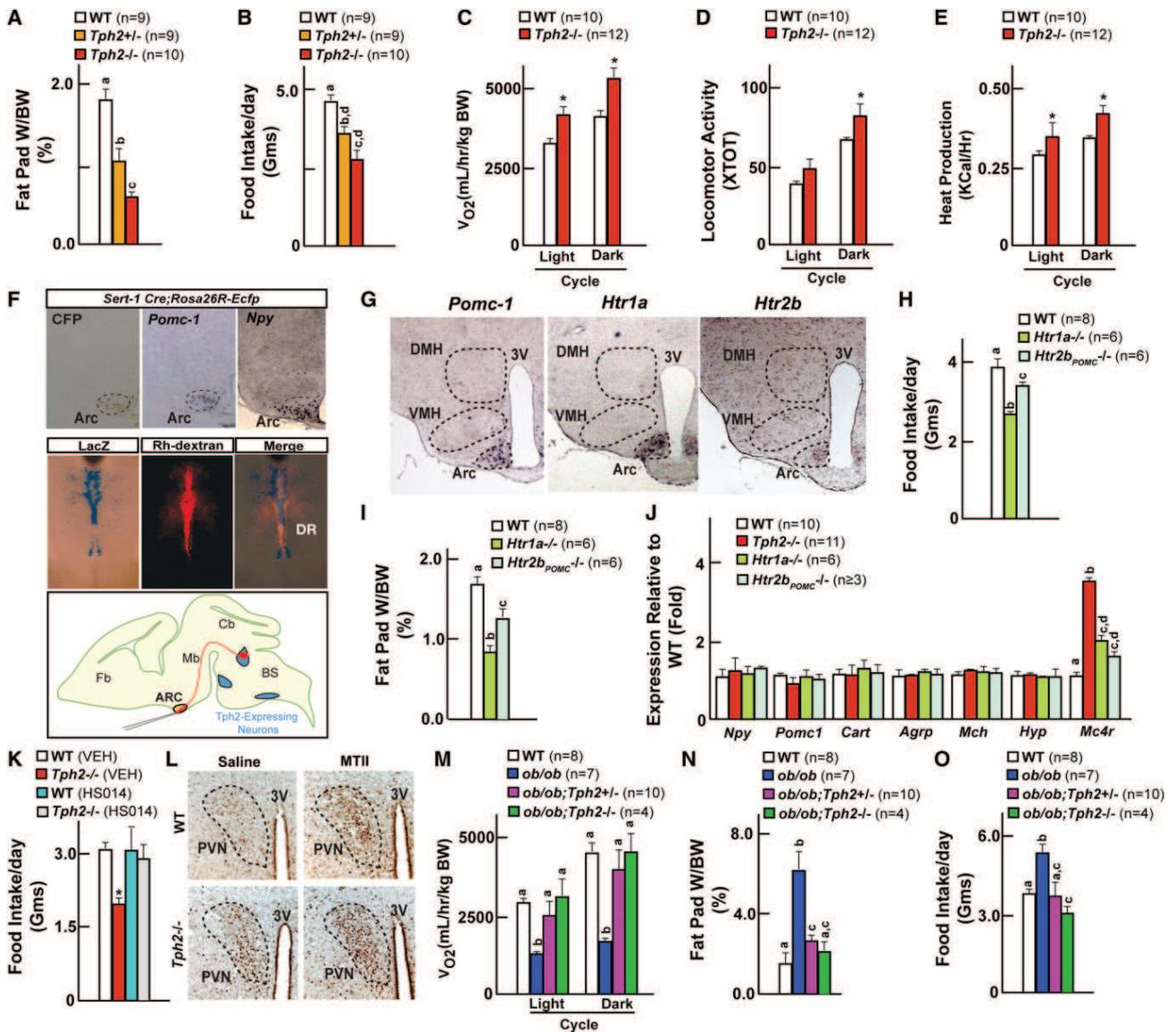
This observation along with the fact that the control of appetite and energy expenditure requires the integrity of the arcuate nuclei of the hypothalamus raised the prospect that axonal projections emanating from *Tph2*-expressing neurons reach arcuate nuclei to regulate these functions. To address this question we crossed *Rosa26-Ecfp* mice with *Sert-cre* mice and analyzed on adjacent sections expression of *Pomc-1* and *Npy*, two arcuate neuron-specific genes (Figures 6F and S4B). This analysis verified that neurons of the arcuate nuclei were targeted by serotonergic innervations emanating from the brainstem, an observation confirmed in the *Tph2<sup>+/-</sup>* mice by retrograde labeling of the projections reaching the serotonergic neurons of the brainstem (Figure 6F). Among all serotonin receptors the most highly expressed in arcuate neurons were *Htr1a*, and, to a lower extent, *Htr2b* and *Htr2c* (Figures 6G and S4C). While food intake was not affected in *Htr2c<sup>-/-</sup>* mice, it was significantly reduced in mice lacking *Htr1a* in all cells (~24% reduction) or lacking *Htr2b* in arcuate neurons only (~10% reduction); fat pad weight was also lower in *Htr1a<sup>-/-</sup>* and *Htr2b<sub>POMC</sub><sup>-/-</sup>* mice (Figures 6H, 6I, and S4D).

We next asked whether expression of genes expressed in hypothalamic neurons and that may mediate leptin regulation of appetite was perturbed in *Tph2<sup>-/-</sup>* mice. Among those tested the only gene whose expression was significantly increased in *Tph2<sup>-/-</sup>* mice was *Mc4r* (Figure 6J), a gene whose inactivation in mice and humans cause hyperphagia and obesity (Huszar et al., 1997; Yeo et al., 1998). Two experimental evidences support the notion that the appetite phenotype of the *Tph2<sup>-/-</sup>* mice was caused, at least in part, by an increase in melanocortin signaling. First, ICV infusion of a *Mc4r* antagonist (HS014) increased appetite ~50% in *Tph2<sup>-/-</sup>* mice (Figure 6K); second ICV infusion of a *Mc4r* agonist (MTII) increased *c-Fos* expression in neurons of the paraventricular and arcuate nuclei of both WT and *Tph2<sup>-/-</sup>* mice (Figures 6L and S6C). Moreover, *Mc4r* expression was increased ~2-fold in *Htr1a<sup>-/-</sup>* and ~1.6-fold in *Htr2b<sub>POMC</sub><sup>-/-</sup>* mice, but was unaffected in *Htr2c<sup>-/-</sup>* mice (Figure 6J and data not shown). Energy expenditure was normal in *Htr1a<sup>-/-</sup>* and *Htr2b<sub>POMC</sub><sup>-/-</sup>* indicating that serotonin uses other receptors, yet to be identified, to regulate this function (Figures S6D–S6G). Taken together these results indicate that BDS regulates appetite and energy expenditure and that for the control of appetite this mediation occurs through the *Htr1a* and *Htr2b* receptors and involves melanocortin signaling.

### Leptin Signaling in Serotonergic Neurons Regulates Appetite, Energy Expenditure, and Bone Mass

Three reasons led us to ask next whether the appetite and energy expenditure phenotypes of the *ob/ob* mice were serotonin-dependent. The first one is that the conjunction of a decrease in appetite and an increase in energy expenditure is the mirror image of what is seen in mice lacking leptin signaling; the second one is that leptin inhibition of serotonin synthesis in the brainstem is the mechanism used by this hormone to inhibit bone mass accrual; the third one is that no molecular mechanisms has been identified so far to explain the common control of bone mass and energy metabolism.

To test this hypothesis we first used *ob/ob;Tph2<sup>+/-</sup>* mice, that have a normal content of serotonin in the brain (Figure 5H).

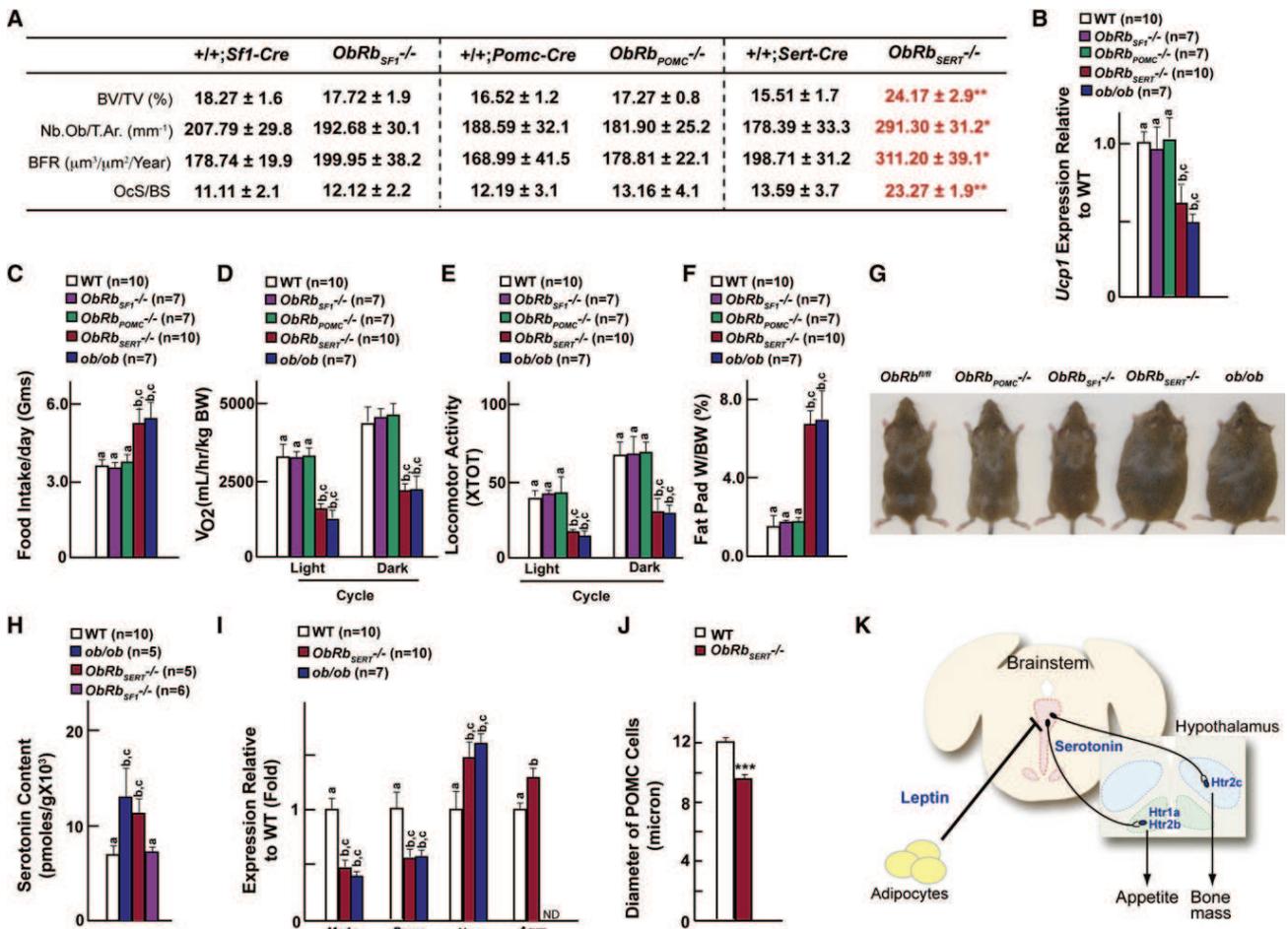


**Figure 6. Serotonin Promotes Food Intake through Htr1a and Htr2b Receptors on Arcuate Neurons**

(A and B) Fat pad weights (A) and food intake (B) in WT, *Tph2*<sup>+/-</sup> and *Tph2*<sup>-/-</sup> mice. (C-E) Energy expenditure in WT and *Tph2*<sup>-/-</sup> mice; measured by volume of oxygen consumption ( $V_{O_2}$ ) (C), locomotor activity (D), and heat production (E). (F) Analysis of axonal projections emanating from the serotonergic neurons. Cross of *Sert-Cre* and *Rosa26REcfp* mice identified projections reaching arcuate (Arc) nuclei in the hypothalamus through *Ecfp* immunohistochemistry colocalized to molecular markers of arcuate neurons (*Pomc-1* and *Npy*) by in situ hybridization. Retrograde Rhodamine dextran labeling of the arcuate neurons identified serotonergic neurons in the brainstem in *Tph2LacZ*<sup>+/+</sup> mice through colocalization of  $\beta$ -galactosidase staining and Rh-dextran fluorescence in serotonergic neurons of the brainstem. (G) In situ hybridization analysis of *Htr1a*, *Htr2b* in *Pomc1*-expressing arcuate neurons of the hypothalamus. 3V: third ventricle. (H and I) Food intake (H) and fat pad weights (I) in WT, *Htr1a*<sup>-/-</sup>, and *Htr2b*<sup>POMC</sup><sup>-/-</sup> mice. (J) qPCR analysis of hypothalamic gene expression in WT, *Htr1a*<sup>-/-</sup> and *Htr2b*<sup>POMC</sup><sup>-/-</sup> mice. (K) Food intake in WT, *Tph2*<sup>-/-</sup> mice before and after *Mc4r* antagonist (HSO14) administration. (L) cFos induction in paraventricular nucleus of hypothalamus in WT, *Tph2*<sup>-/-</sup> mice before and after acute administration *Mc4r* agonist (MTII). 3V: third ventricle. (M-O) Volume of oxygen consumption (M), fat pad weight (N) and food intake (O) in WT, *ob/ob*, *ob/ob;Tph2*<sup>+/-</sup>, and *ob/ob;Tph2*<sup>-/-</sup> mice. For all panels (except [A], [B], [H-J], and [M-O]): \* p < 0.05; \*\* p < 0.01 (Student's t test). Error bars represent SEM. For (A), (B), (H-J), and (M-O): one-way ANOVA, Newman-Keuls test; different letters on two or more bars indicate significant differences between the respective groups (p < 0.05).

Remarkably, *ob/ob;Tph2*<sup>+/-</sup> mice also had appetite and energy expenditure parameters undistinguishable from WT littermates (Figures 6M-6O and data not shown) suggesting that leptin

must inhibit BDS synthesis in order to decrease appetite and to increase energy expenditure. Consistent with this hypothesis *ob/ob* mice unable to synthesize serotonin at all in the brain (*ob/ob*;



**Figure 7. ObRb Expression in Serotonergic Neurons Is Necessary and Sufficient for Leptin Regulation of Bone Mass Accrual, Appetite, and Energy Expenditure**

(A) Histomorphometric analysis (vertebrae) of *+/+;Sf1-Cre*, *ObRb<sub>SF1</sub><sup>-/-</sup>*, *+/+;Pomc1-Cre*, *ObRb<sub>POMC</sub><sup>-/-</sup>*, *+/+;Sert-Cre* and *ObRb<sub>SERT</sub><sup>-/-</sup>* mice. (B) qPCR analysis of *Ucp1* expression in brown adipose tissue in WT, *ObRb<sub>SF1</sub><sup>-/-</sup>*, *ObRb<sub>POMC</sub><sup>-/-</sup>* and *ObRb<sub>SERT</sub><sup>-/-</sup>* mice. WT refers to *+/+;Sf1-Cre*, *+/+;Pomc1-Cre* or *+/+;Sert-Cre*. (C–F) Food intake (C) volume of oxygen consumption (D), locomotor activity (E), and fat pad weights (F) in WT, *ObRb<sub>SF1</sub><sup>-/-</sup>*, *ObRb<sub>POMC</sub><sup>-/-</sup>*, and *ObRb<sub>SERT</sub><sup>-/-</sup>* mice. (G) Representative photomicrographs of WT, *ObRb<sub>SF1</sub><sup>-/-</sup>*, *ObRb<sub>POMC</sub><sup>-/-</sup>*, and *ObRb<sub>SERT</sub><sup>-/-</sup>* mice. (H) Brainstem serotonin content in WT, *ob/ob*, *ObRb<sub>SERT</sub><sup>-/-</sup>*, and *ObRb<sub>SF1</sub><sup>-/-</sup>* mice. (I) qPCR analysis in the hypothalamus in WT, *ObRb<sub>SERT</sub><sup>-/-</sup>*, and *ob/ob* mice. (J) Diameter of *Pomc*-expressing cells in WT and *ObRb<sub>SERT</sub><sup>-/-</sup>* mice. (K) Model of the leptin-dependent regulation of bone mass and appetite. Leptin inhibits release of brainstem-derived serotonin, which favors bone mass accrual and appetite. Adipocytes are in yellow; serotonergic neurons are in pink; VMH is in blue and arcuate is in green. For all panels (except [B–F], [H], and [I]): \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  (Student’s test). Error bars represent the SEM. For (B–F), (H), and (I): one-way ANOVA, Newman-Keuls test; different letters on two or more bars indicate significant differences between the respective groups ( $p < 0.05$ ).

*Tph2<sup>-/-</sup>*) had even a lower appetite than WT mice; as a result their fat pad weights were significantly smaller than the ones of *ob/ob* littermates (Figures 6M–6O).

Next, to establish that serotonergic neurons of the brainstem and BDS are a critically important entry point and target of leptin in the brain, we analyzed bone mass, appetite and energy expenditure in mouse strains lacking *ObRb* in distinct neuronal populations in the brain (Figures S7A and S7B). This analysis was performed on mice fed a normal diet since leptin signaling-deficient mice develop a massive obesity on this diet. The spec-

ificity of *Cre* expression was verified for each mouse line by crossing them with *RosaR26* mice and by in situ hybridization (Soriano, 1999) (Figures S7A and S7B).

As reported previously mice lacking *ObRb* either in *Sf1*-expressing neurons of the VMH nuclei or in *Pomc*-expressing neurons of the arcuate nuclei had normal sympathetic activity, bone remodeling parameters and bone mass; they also had normal appetite, energy expenditure and body weight (Figures 7A–7G and S7A–S7I) (Balthasar et al., 2004; Dhillon et al., 2006). In contrast *ObRb<sub>SERT</sub><sup>-/-</sup>* mice lacking *ObRb* in

serotonergic neurons of the brainstem developed rapidly, a low sympathetic activity, high bone mass phenotype and a similar increase in appetite as *ob/ob* mice; they also had low energy expenditure (Figures 7A–7G). As a result *ObRb<sub>SERT</sub><sup>-/-</sup>* mice, when fed a normal diet, developed an obesity phenotype of similar severity and at a similar pace than mice lacking leptin signaling (Figures 7G and S7E). Serotonin in the brain of *ObRb<sub>SERT</sub><sup>-/-</sup>* was elevated to the same extent as in *ob/ob* mice, while it was normal in the brain of *ObRb<sub>SERT</sub><sup>-/-</sup>* mice (Figure 7H). Remarkably for our purpose hypothalamus gene expression analysis by real-time PCR revealed a decrease in *Mc4r* and *Pomc* expression, and an increase in *Npy* and *Agrp* expression in *ObRb<sub>SERT</sub><sup>-/-</sup>* mice that is of similar severity to the one observed in *ob/ob* mice. (Figure 7I).

*ObRb* deletion in *Tph2*-expressing neurons also had an organizational effect on *Pomc*-expressing neurons of the arcuate nuclei. Indeed, the average diameter of *Pomc*-expressing neurons in *ObRb<sub>SERT</sub><sup>-/-</sup>* mice ( $n = 42$ ) was significantly lower than in WT mice (Figure 7J). The lower POMC perikaryal diameter of *ob/ob* mice is associated with a ~50% decrease in the number of perikaryal synapse density of POMC neurons (Pinto et al., 2004). Altered synaptic input organization of POMC neurons was also detected in *ObRb<sub>SERT</sub><sup>-/-</sup>* mice ( $14.76 \pm 1.3$  versus  $27.31 \pm 2.03$  synapses per 100 micron perikaryal membrane in *ObRb<sub>SERT</sub><sup>-/-</sup>* and WT mice respectively). Thus, it is likely that the *ob/ob* phenotype of POMC neurons is determined, at least in part, by leptin signaling in serotonergic neurons of the brainstem.

## DISCUSSION

The results presented here demonstrate that in order to regulate bone mass accrual, appetite and energy expenditure leptin needs to inhibit the electrical activity and serotonin synthesis in *Tph2*-expressing neurons of the brainstem (Figure 7K). These results modify the map of leptin signaling in the brain and indicate that the serotonergic neuronal circuitry exerts a more fundamental influence on several homeostatic functions than previously thought. Moreover, they identify BDS as the long sought-after molecular basis for the common control of bone mass and energy metabolism.

### Brain-Derived Serotonin Regulation of Bone Mass

This effort to complete our understanding of the regulation of bone mass by serotonin led to two unexpected results. The first one is that, depending on its site of synthesis, serotonin regulates bone mass accrual in opposite directions: it inhibits it when synthesized in the duodenum and favors it when acting as a neurotransmitter. To our knowledge this is the first example of a molecule exerting different influences on bone remodeling depending on its site of synthesis. The central function of serotonin is mediated through the *Htr2c* receptor expressed in VMH neurons. *Htr2c<sup>-/-</sup>* mice are markedly osteopenic before any metabolic modification is detectable, indicating that serotonin regulation of bone mass occurs independently of its effects, through *Htr2c*, on energy metabolism. Given what is known about the molecular signaling of serotonin in osteoblasts (Yadav

et al., 2008), future studies are needed to determine whether BDS recruits the same transcription factor(s) in VMH neurons.

The second surprising observation is that although it accounts only for a rather small portion of the total pool of serotonin in the body (~5%) BDS influence on bone remodeling is dominant over that exerted by gut-derived serotonin. Since BDS synthesis is regulated by leptin these results infer that leptin regulation of bone mass is more important than the one exerted by gut-derived serotonin (Yadav et al., 2008). This observation along with the fact that leptin appears during evolution with a bony skeleton underscores the importance of the regulation of bone remodeling in the panoply of leptin's function; it also predicts that using leptin as a treatment for obesity would favor appearance of osteoporosis.

Patients taking chronically serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) have an increased risk of osteoporotic fractures (Richards et al., 2007). Consistent with this observation an animal model reproducing this chronic use of SSRIs, namely mice lacking 5-hydroxytryptamine transporter (5HTT), a molecule responsible for serotonin reuptake by cells, also develop a low bone mass phenotype (Warden et al., 2005). Surprisingly however, this low bone mass phenotype cannot be ascribed to an increase in circulating serotonin levels i.e., to gut-derived serotonin, since serotonin is undetectable in the plasma of these mice (data not shown). The low bone mass of *5Htt<sup>-/-</sup>* mice further supports the notion that BDS exerts a dominant role in the regulation of bone mass.

### Serotonin Regulation of Appetite and Energy Expenditure

The study of BDS functions led to other unexpected findings beyond the control of bone mass. Indeed the deletion of *Tph2* shows that BDS is a powerful orexigenic molecule in vertebrates. This function of BDS is similar to the function of serotonin in invertebrates (Nonogaki et al., 1998; Srinivasan et al., 2008). Genetic analysis showed that the orexigenic effect of serotonin occurs through *Htr1a* and *Htr2b* receptors, in a *Mc4r*-dependent manner (Heisler et al., 2002; Lam et al., 2008). This role of *Htr1a* in the regulation of appetite is consistent with the orexigenic action of *Htr1a* agonists (Gilbert et al., 1988; Neill and Cooper, 1988). The demonstration that it is through its expression in arcuate neurons that *Htr1a* regulates appetite will need generation of a cell-specific deletion of this gene.

The fact that removal of the ligand and addition of a pharmacological agonist of a receptor result in the same phenotype, i.e., anorexia, could have several explanations (Vickers et al., 1999). For instance, it is possible that signaling through some serotonin receptors may antagonize signaling through others. Likewise, it should be noted that in most settings the effect of pharmacologic agents are acute while by definition the effect of gene deletion is chronic. Lastly, it is also possible that different serotonin receptors regulate differently food intake possibly even on the same neuron (Xu et al., 2008).

### Brain-Derived Serotonin as a Target of Leptin

Several lines of evidence suggested initially that leptin regulates bone mass, appetite and energy expenditure following binding to its receptors located on hypothalamic neurons. Chief among

those are the facts that the hypothalamus is a known regulator of most homeostatic functions and that *ObRb* is highly expressed in various hypothalamic neuronal populations (Elmqvist et al., 2005). Surprisingly however, deletion of *ObRb* in those hypothalamic neuronal populations did not affect any of these three functions (Balthasar et al., 2004; Dhillon et al., 2006). These latter findings suggested the following hypothesis: leptin would act in other parts of the brain where its receptor is expressed to affect synthesis of neurotransmitter(s), which would then act in hypothalamic neurons. That serotonin is the initial target in the brain of leptin regulation of bone mass accrual was an incentive to test whether it could also be implicated in the leptin regulation of appetite and energy expenditure.

We show here, through cell-specific gene deletion of *Tph2* or the leptin receptor, that BDS enhances appetite and decreases energy expenditure and that leptin regulates these functions by inhibiting BDS synthesis. Thus leptin does use the same mechanism to regulate bone mass accrual, appetite and energy expenditure. We remain aware however, that these data do not exclude formally the possibility that leptin acts also on hypothalamic neurons at a level not detectable using cell-specific gene deletion experiments. For instance, our study does not rule out an involvement of *Agrp*-expressing neurons in the control of various aspects of energy metabolism (van de Wall et al., 2008). This is especially true since *Agrp* expression is similarly increased in *ObRb<sub>SERT</sub><sup>-/-</sup>* and *ob/ob* mice. By identifying brainstem serotonergic neurons as an initial target of leptin this study provides a cellular and molecular explanation for the apparent contradiction between the fact that chemical lesioning of hypothalamic neurons hampers leptin signaling while inactivating *ObRb* in these neurons does not. A question raised by our work is to know what are the functions of the leptin receptor expressed in hypothalamic neurons? At the present time it seems that *ObRb* expression on these neurons is mainly needed for the regulation of insulin secretion and glucose metabolism (Coppari et al., 2005; Hinoi et al., 2008; van de Wall et al., 2008) a function not affected by serotonin or leptin signaling in serotonergic neurons (Figure S1). Indeed it is important to underscore that serotonin is not implicated in all functions of leptin, for instance *ob/ob;Tph2<sup>+/-</sup>*, as *ob/ob* mice, are sterile.

### Coregulation of Bone Remodeling and Energy Metabolism

Why would bone remodeling and energy metabolism need to be coregulated in the first place? To answer this question, one needs to look at what was the original purpose of bone remodeling earlier during evolution. Through its ability to constantly renew bone the original function of bone remodeling was to repair micro and macro damages, i.e., fractures of bones. This function was, early on, absolutely necessary to maintain mobility and therefore to assure survival. In addition, bone remodeling is characterized by two opposing processes: destruction followed by de novo formation; these two cellular events are costly in terms of energy; even more so if one takes into account that they occur simultaneously in multiple locations. Thus, for bone remodeling to occur there must be a constant supply of energy channeled to osteoclasts and osteoblasts. This view of bone remodeling predicts that there should be one or several hormones, appearing during evolution with this function, and regulating it and energy metab-

olism. To date leptin is the only known hormone fulfilling all these criteria. This view of bone remodeling also implies that the metabolic importance of the skeleton that begins to be unraveled (Lee et al., 2007) has not been fully characterized yet.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

### Mice Generation

*Tph2-LacZ* mice were generated by embryonic stem cell manipulations following standard protocols to obtain *Tph2<sup>+/-</sup>* mice. *Tph2<sup>+/-</sup>* mice were intercrossed to obtain the WT, *Tph2<sup>+/-</sup>*, and *Tph2<sup>-/-</sup>* mice for analysis. Generation of *Tph1<sup>-/-</sup>*, *Htr2c<sup>-/-</sup>*, loxTB *Htr2c*, *Htr1a<sup>-/-</sup>*, *ObRb<sup>fl/fl</sup>*, *Htr2b<sup>fl/fl</sup>*, *Sf1-Cre*, and *Sert-Cre* mice was previously reported (Balthasar et al., 2004; Dhillon et al., 2006; Klemenhagen et al., 2006; Tecott et al., 1995; van de Wall et al., 2008; Xu et al., 2008; Yadav et al., 2008; Zhuang et al., 2005). WT, *Pomc1-Cre* and *ob/ob* mice were obtained from The Jackson Laboratory.

### Histological Procedures, Immunohistochemistry, In Situ Hybridization, Axonal Tracing, and Microcomputed Tomography Analysis

Sections containing dorsal raphe were from bregma -4.04 to -5.40; median raphe from -4.04 to -4.48; caudal raphe from -4.84 to -7.48; arcuate from -1.22 to -2.80; VMH from -1.06 to -2.06 and PVN from -0.58 to -1.22 according to Franklin and Paxinos mouse brain atlas. Immunohistochemistry was performed on paraffin-embedded specimens sectioned at 6  $\mu$ m according to standard protocols. LacZ staining was performed on whole brain and coronal sections obtained from the *Tph2<sup>+/-</sup>* mice following standard procedures. In situ hybridization on brain sections was performed as described (Oury et al., 2006). Ex vivo axonal tracing was performed using Rhodamine-conjugated dextrans (Molecular Probes, Eugene, Oregon) as described (Supplemental Experimental Procedures for details). Bone histomorphometric analyses were performed on undecalcified sections using the Osteomeasure analysis system (Osteometrics, Atlanta). Trabecular bone architecture of proximal tibia was assessed using a  $\mu$ CT system (VivaCT 40, SCANCO Medical AG, Switzerland) as described (Shi et al., 2008). Six to 12 animals were analyzed for each group.

### Bioassays

Serotonin levels in the brain and serum were quantified as described (Yadav et al., 2008). Serum level of total deoxyypyridinoline (DPD) cross-links was measured using the Metra tDPD kit (Quidel corp. San Diego, CA). Urinary elimination of catecholamines was measured in acidified spot urine samples by EIA (Bi-CAT, Alpco Diagnostics, Salem, NH) and creatinine (Metra creatinine kit, Quidel corp. San Diego, CA) used to standardize between urine samples.

### Molecular Studies

RNA isolation, cDNA preparation and qPCR analysis was carried out following standard protocols (See Supplemental Experimental Procedures). Genotypes of all the mice were determined by PCR. All primer sequences for genotyping and DNA probes for southern hybridization are available upon request.

### Electrophysiology, Food Intake, and Energy Expenditure Measurements

Brain slice preparation and electrophysiological recording were performed as described (Liu et al., 2002; Rao et al., 2007; Supplemental Experimental Procedures). Food intake was measured using metabolic cages (Nalgene, Rochester, NY) and energy expenditure by indirect calorimetry method as described (Shi et al., 2008; Supplemental Experimental Procedures).

### Statistical Analyses

Statistical significance was assessed by Student's t test or a one way ANOVA followed by Newman-Keuls test for comparison between more than two groups.  $p < 0.05$  was considered significant. Different letters indicate significant differences among groups.

## SUPPLEMENTAL DATA

Supplemental Data include eleven figures, Supplemental Experimental Procedures, Supplemental References, and a video summary and can be found with this article online at [http://www.cell.com/supplemental/S0092-8674\(09\)00907-6](http://www.cell.com/supplemental/S0092-8674(09)00907-6).

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank G. Ren for mouse genotyping, Yung-Yu Huang for HPLC analysis, X. Sherry Liu for MicroCT analysis, Marya Shanabrough for electrophysiological recordings, and Dr. Patricia Ducy for critical reading of the manuscript. Special thanks to Drs. Bradford B. Lowell, Joel K. Elmquist, Streamson Chua Jr., Yong Xu, Harveen Dhillon and J.M. Zigman for generously providing *loxTB Htr2c*, *ObRb* floxed, and *Sf1-Cre* mice. This work was supported by grants from the NIH (G.K.), a Gideon and Sevgi Rodan fellowship from IBMS (V.K.Y.), HFSP (F.O.), FRM (F.O.), foundation Bettencourt Schueller (F.O. and C.C.), and the Philippe foundation (F.O. and C.C.). G.K. is the founder of Escouclab.

Received: January 23, 2009

Revised: May 26, 2009

Accepted: June 5, 2009

Published: September 3, 2009

## REFERENCES

- Aston-Jones, G., Akaoka, H., Charlety, P., and Chouvet, G. (1991). Serotonin selectively attenuates glutamate-evoked activation of noradrenergic locus coeruleus neurons. *J. Neurosci.* *11*, 760–769.
- Balthasar, N., Coppari, R., McMinn, J., Liu, S.M., Lee, C.E., Tang, V., Kenny, C.D., McGovern, R.A., Chua, S.C., Jr., Elmquist, J.K., et al. (2004). Leptin receptor signaling in POMC neurons is required for normal body weight homeostasis. *Neuron* *42*, 983–991.
- Cohen, P., Zhao, C., Cai, X., Montez, J.M., Rohani, S.C., Feinstein, P., Mombaerts, P., and Friedman, J.M. (2001). Selective deletion of leptin receptor in neurons leads to obesity. *J. Clin. Invest.* *108*, 1113–1121.
- Coppari, R., Ichinose, M., Lee, C.E., Pullen, A.E., Kenny, C.D., McGovern, R.A., Tang, V., Liu, S.M., Ludwig, T., Chua, S.C., Jr., et al. (2005). The hypothalamic arcuate nucleus: a key site for mediating leptin's effects on glucose homeostasis and locomotor activity. *Cell Metab.* *1*, 63–72.
- Dhillon, H., Zigman, J.M., Ye, C., Lee, C.E., McGovern, R.A., Tang, V., Kenny, C.D., Christiansen, L.M., White, R.D., Edelstein, E.A., et al. (2006). Leptin directly activates SF1 neurons in the VMH, and this action by leptin is required for normal body-weight homeostasis. *Neuron* *49*, 191–203.
- Ducy, P., Amling, M., Takeda, S., Priemel, M., Schilling, A.F., Beil, F.T., Shen, J., Vinson, C., Rueger, J.M., and Karsenty, G. (2000). Leptin inhibits bone formation through a hypothalamic relay: a central control of bone mass. *Cell* *100*, 197–207.
- Eleftheriou, F., Ahn, J.D., Takeda, S., Starbuck, M., Yang, X., Liu, X., Kondo, H., Richards, W.G., Bannion, T.W., Noda, M., et al. (2005). Leptin regulation of bone resorption by the sympathetic nervous system and CART. *Nature* *434*, 514–520.
- Elmquist, J.K. (2000). Anatomic basis of leptin action in the hypothalamus. *Front. Horm. Res.* *26*, 21–41.
- Elmquist, J.K., Coppari, R., Balthasar, N., Ichinose, M., and Lowell, B.B. (2005). Identifying hypothalamic pathways controlling food intake, body weight, and glucose homeostasis. *J. Comp. Neurol.* *493*, 63–71.
- Eyre, D.R., Dickson, I.R., and Van Ness, K. (1988). Collagen cross-linking in human bone and articular cartilage. Age-related changes in the content of mature hydroxyproline residues. *Biochem* *252*, 494–500.
- Friedman, J.M., and Halaas, J.L. (1998). Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature* *395*, 763–770.
- Gilbert, F., Dourish, C.T., Brazell, C., McClue, S., and Stahl, S.M. (1988). Relationship of increased food intake and plasma ACTH levels to 5-HT<sub>1A</sub> receptor activation in rats. *Psychoneuroendocrinology* *13*, 471–478.
- Heath, M.J., and Hen, R. (1995). Serotonin receptors. Genetic insights into serotonin function. *Curr. Biol.* *5*, 997–999.
- Heisler, L.K., Cowley, M.A., Tecott, L.H., Fan, W., Low, M.J., Smart, J.L., Rubinstein, M., Tatro, J.B., Marcus, J.N., Holstege, H., et al. (2002). Activation of central melanocortin pathways by fenfluramine. *Science* *297*, 609–611.
- Hinoi, E., Gao, N., Jung, D.Y., Yadav, V., Yoshizawa, T., Myers, M.G., Jr., Chua, S.C., Jr., Kim, J.K., Kaestner, K.H., and Karsenty, G. (2008). The sympathetic tone mediates leptin's inhibition of insulin secretion by modulating osteocalcin bioactivity. *J. Cell Biol.* *183*, 1235–1242.
- Horvitz, H.R., Chalfie, M., Trent, C., Sulston, J.E., and Evans, P.D. (1982). Serotonin and octopamine in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Science* *216*, 1012–1014.
- Huszar, D., Lynch, C.A., Fairchild-Huntress, V., Dunmore, J.H., Fang, Q., Berkemeier, L.R., Gu, W., Kesterson, R.A., Boston, B.A., Cone, R.D., et al. (1997). Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice. *Cell* *88*, 131–141.
- Jensen, P., Farago, A.F., Awatramani, R.B., Scott, M.M., Deneris, E.S., and Dymecki, S.M. (2008). Redefining the serotonergic system by genetic lineage. *Nat. Neurosci.* *11*, 417–419.
- Karsenty, G. (2006). Convergence between bone and energy homeostases: Leptin regulation of bone mass. *Cell Metab.* *4*, 341–348.
- Klemenhagen, K.C., Gordon, J.A., David, D.J., Hen, R., and Gross, C.T. (2006). Increased fear response to contextual cues in mice lacking the 5-HT<sub>1A</sub> receptor. *Neuropsychopharmacology* *31*, 101–111.
- Lam, D.D., Przydzial, M.J., Ridley, S.H., Yeo, G.S., Rochford, J.J., O'Rahilly, S., and Heisler, L.K. (2008). Serotonin 5-HT<sub>2C</sub> receptor agonist promotes hypophagia via downstream activation of melanocortin 4 receptors. *Endocrinology* *149*, 1323–1328.
- Lee, N.K., Sowa, H., Hinoi, E., Ferron, M., Ahn, J.D., Confavreux, C., Dacquin, R., Mee, P.J., McKee, M.D., Jung, D.Y., et al. (2007). Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton. *Cell* *130*, 456–469.
- Liu, R.J., van den Pol, A.N., and Aghajanian, G.K. (2002). Hypocretins (orexins) regulate serotonin neurons in the dorsal raphe nucleus by excitatory direct and inhibitory indirect actions. *J. Neurosci.* *22*, 9453–9464.
- Mann, J.J., McBride, P.A., Brown, R.P., Linnoila, M., Leon, A.C., DeMeo, M., Mieczkowski, T., Myers, J.E., and Stanley, M. (1992). Relationship between central and peripheral serotonin indexes in depressed and suicidal psychiatric inpatients. *Arch. Gen. Psychiatry* *49*, 442–446.
- Neill, J.C., and Cooper, S.J. (1988). MDL 72832, a selective 5-HT<sub>1A</sub> receptor ligand, stereospecifically increases food intake. *Eur. J. Pharmacol.* *151*, 329–332.
- Nonogaki, K., Strack, A.M., Dallman, M.F., and Tecott, L.H. (1998). Leptin-independent hyperphagia and type 2 diabetes in mice with a mutated serotonin 5-HT<sub>2C</sub> receptor gene. *Nat. Med.* *4*, 1152–1156.
- Oury, F., Murakami, Y., Renaud, J.S., Pasqualetti, M., Charnay, P., Ren, S.Y., and Rijli, F.M. (2006). Hoxa2- and rhombomere-dependent development of the mouse facial somatosensory map. *Science* *313*, 1408–1413.
- Pasqualetti, M., Ori, M., Marazziti, D., Castagna, M., and Nardi, I. (1998). Distribution of 5-HT<sub>2c</sub> and 5-HT<sub>5a</sub> receptor mRNA in human brain. *Ann. N Y Acad. Sci.* *861*, 245.
- Pinto, S., Roseberry, A.G., Liu, H., Diano, S., Shanabrough, M., Cai, X., Friedman, J.M., and Horvath, T.L. (2004). Rapid rewiring of arcuate nucleus feeding circuits by leptin. *Science* *304*, 110–115.
- Pogoda, P., Egermann, M., Schnell, J.C., Priemel, M., Schilling, A.F., Alini, M., Schinke, T., Rueger, J.M., Schneider, E., Clarke, I., et al. (2006). Leptin inhibits bone formation not only in rodents, but also in sheep. *J. Bone Miner. Res.* *21*, 1591–1599.
- Rao, Y., Liu, Z.W., Borok, E., Rabenstein, R.L., Shanabrough, M., Lu, M., Picciotto, M.R., Horvath, T.L., and Gao, X.B. (2007). Prolonged wakefulness

- induces experience-dependent synaptic plasticity in mouse hypocretin/orexin neurons. *J. Clin. Invest.* *117*, 4022–4033.
- Richards, J.B., Papaioannou, A., Adachi, J.D., Joseph, L., Whitson, H.E., Prior, J.C., and Goltzman, D. (2007). Effect of selective serotonin reuptake inhibitors on the risk of fracture. *Arch. Intern. Med.* *167*, 188–194.
- Shi, Y., Yadav, V.K., Suda, N., Liu, X.S., Guo, X.E., Myers, M.G., Jr., and Karsenty, G. (2008). Dissociation of the neuronal regulation of bone mass and energy metabolism by leptin in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *105*, 20529–20533.
- Soriano, P. (1999). Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain. *Nat. Genet.* *14*, 670–689.
- Spiegelman, B.M., and Flier, J.S. (2001). Obesity and the regulation of energy balance. *Cell* *104*, 531–543.
- Srinivas, S., Watanabe, T., Lin, C.S., Williams, C.M., Tanabe, Y., Jessell, T.M., and Costantini, F. (2001). Cre reporter strains produced by targeted insertion of EYFP and ECFP into the ROSA26 locus. *BMC Dev. Biol.* *1*, 4.
- Srinivasan, S., Sadegh, L., Elle, I.C., Christensen, A.G., Faergeman, N.J., and Ashrafi, K. (2008). Serotonin regulates *C. elegans* fat and feeding through independent molecular mechanisms. *Cell Metab.* *7*, 533–544.
- Takeda, S., Eleftheriou, F., Levasseur, R., Liu, X., Zhao, L., Parker, K.L., Armstrong, D., Ducy, P., and Karsenty, G. (2002). Leptin regulates bone formation via the sympathetic nervous system. *Cell* *111*, 305–317.
- Tecott, L.H., Sun, L.M., Akana, S.F., Strack, A.M., Lowenstein, D.H., Dallman, M.F., and Julius, D. (1995). Eating disorder and epilepsy in mice lacking 5-HT<sub>2c</sub> serotonin receptors. *Nature* *374*, 542–546.
- van de Wall, E., Leshan, R., Xu, A.W., Balthasar, N., Coppari, R., Liu, S.M., Jo, Y.H., MacKenzie, R.G., Allison, D.B., Dun, N.J., et al. (2008). Collective and individual functions of leptin receptor modulated neurons controlling metabolism and ingestion. *Endocrinology* *149*, 1773–1785.
- Vickers, S.P., Clifton, P.G., Dourish, C.T., and Tecott, L.H. (1999). Reduced satiating effect of d-fenfluramine in serotonin 5-HT<sub>2C</sub> receptor mutant mice. *Psychopharmacology (Berl.)* *143*, 309–314.
- Waddington, S.N., Buckley, S.M., David, A.L., Peebles, D.M., Rodeck, C.H., and Coutelle, C. (2007). Fetal gene transfer. *Curr. Opin. Mol. Ther.* *9*, 432–438.
- Walther, D.J., Peter, J.U., Bashammakh, S., Horthagl, H., Voits, M., Fink, H., and Bader, M. (2003). Synthesis of serotonin by a second tryptophan hydroxylase isoform. *Science* *299*, 76.
- Warden, S.J., Robling, A.G., Sanders, M.S., Bliziotis, M.M., and Turner, C.H. (2005). Inhibition of the serotonin (5-hydroxytryptamine) transporter reduces bone accrual during growth. *Endocrinology* *146*, 685–693.
- Xu, Y., Jones, J.E., Kohno, D., Williams, K.W., Lee, C.E., Choi, M.J., Anderson, J.G., Heisler, L.K., Zigman, J.M., Lowell, B.B., et al. (2008). 5-HT<sub>2CRs</sub> expressed by pro-opiomelanocortin neurons regulate energy homeostasis. *Neuron* *60*, 582–589.
- Yadav, V.K., Ryu, J.H., Suda, N., Tanaka, K.F., Gingrich, J.A., Schutz, G., Glorieux, F.H., Chiang, C.Y., Zajac, J.D., Insogna, K.L., et al. (2008). Lrp5 controls bone formation by inhibiting serotonin synthesis in the duodenum. *Cell* *135*, 825–837.
- Yeo, G.S., Farooqi, I.S., Aminian, S., Halsall, D.J., Stanhope, R.G., and O'Rahilly, S. (1998). A frameshift mutation in MC4R associated with dominantly inherited human obesity. *Nat. Genet.* *20*, 111–112.
- Zhuang, X., Masson, J., Gingrich, J.A., Rayport, S., and Hen, R. (2005). Targeted gene expression in dopamine and serotonin neurons of the mouse brain. *J. Neurosci. Methods* *143*, 27–32.

## VI- Perspectives

### 1) Masse osseuse des patients sous Prozac et ISRS

La sérotonine est une cible privilégiée du traitement de la dépression. Il est intéressant d'analyser les résultats des effets secondaires osseux des antidépresseurs inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine (ISRS) à la lumière des résultats biologiques présentés précédemment d'autant plus que des variations pondérales sont rapportées avec les antidépresseurs ISRS <sup>48</sup>.

Les ISRS sont très largement prescrits en première ligne pour le traitement des dépressions majeures ainsi que différentes pathologies psychiatriques dont le stress post-traumatique, l'anxiété généralisée, les attaques de panique, les troubles de l'humeur prémenstruels et un certain nombre de pathologies non psychiatriques comme la douleur chronique, la fibromyalgie et les symptômes vasomoteurs périménopausiques. Plusieurs études ont montré une action des antidépresseurs ISRS sur la densitométrie osseuse. Les études transversales sont en faveur d'une association entre ISRS et faible masse osseuse aussi bien chez les hommes que chez les femmes. Après ajustement, la différence de masse osseuse entre les patientes traitées et non traitées varie entre 2,4 et 6,2 % suivants les sites anatomiques considérés <sup>49-52</sup>.

Dans la SOF, en analyse longitudinale le risque relatif de perte osseuse aggravée est de 1,6 pour les patientes traitées <sup>49</sup>. Dans les études à très grande échelle de type National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III) chez les sujets féminins et masculins de plus de 17 ans ou chez les femmes ménopausées de la Women Health Initiative (WHI) aucune association entre l'utilisation d'antidépresseurs et la masse osseuse n'a été retrouvée <sup>53, 54</sup>. Les études de cohorte comme la Geelong Osteoporosis Study permettant un bon contrôle de toutes les variables des patients pour l'ajustement sur les symptômes dépressifs, les chutes et un effectif suffisant de patients pour une bonne puissance statistique ont confirmé l'effet osseux délétère des antidépresseurs ISRS. La cohorte Osteoporotic Fractures in Men (MrOs) montre une augmentation du risque de fracture non vertébrale <sup>55</sup>. Dans l'étude multicentrique CaMOs le hazard ratio du risque de fracture clinique à 5 ans des patients âgés de plus de 50 ans sous antidépresseurs ISRS est de 2,1 (1,3-3,4) <sup>51</sup>. L'étude de Rotterdam rejoint ce niveau d'excès de risque avec un HR à 2.35 (1,32-4,18) pour le risque de fracture non vertébrale <sup>56</sup>.

Des études cas-témoins utilisant de grandes bases de données administratives au Danemark <sup>57</sup>, au Canada (Manitoba, Ontario) <sup>58, 59</sup> ou aux États-Unis (Michigan) <sup>60</sup> ont également montré une association entre l'utilisation d'antidépresseurs et l'augmentation du risque fracturaire. L'étude de Bolton par exemple <sup>58</sup> montre un odd-ratio de 1.45 (1,32-1.59). Par rapport aux tricycliques, l'effet osseux des ISRS est plus important et dose dépendant. Cette notion de dose est intéressante car les antidépresseurs tricycliques sont des inhibiteurs moins puissants du transport de la sérotonine que les ISRS, confortant l'effet dose observé avec les ISRS <sup>61</sup>.

Il semble clairement établi épidémiologiquement, même si nous ne disposons pas d'essai randomisé, que les antidépresseurs ISRS constituent un facteur de risques de fragilisation osseuse. La question posée par ces études est de savoir s'il est nécessaire de dépister à grande échelle les patients traités par antidépresseur à la recherche d'une fragilité osseuse. Pour certains, tout patient sous antidépresseurs ISRS devrait bénéficier d'une évaluation osseuse et recevoir au moins un conseil hygiénodététique ainsi qu'une correction de la carence en vitamine D <sup>62</sup>.

Ces études confirment que la sérotonine a bien une action sur la masse osseuse. Toutefois, les inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine (ISRS) sont des antidépresseurs qui agissent dans le cerveau en augmentant le taux de la sérotonine libre (5-hydroxytryptamine ou 5-HT) dans la synapse suite au blocage des pompes de la recapture de la sérotonine des neurones présynaptiques. Dès lors, les résultats de ces études épidémiologiques viennent en contradiction avec le résultat de notre travail établissant que la sérotonine cérébrale stimule la masse osseuse (en bloquant le tonus sympathique) et stimule l'appétit (orexigénique). Aucune explication nette à cette divergence n'a pour l'instant été apportée. Une des pistes réside dans l'existence d'une dualité d'action de la sérotonine sur la masse osseuse : stimulatrice au niveau cérébral et inhibitrice en périphérie <sup>46</sup>. Les antidépresseurs ISRS semblent affecter aussi bien le transport de la sérotonine cérébrale que de la sérotonine périphérique <sup>63</sup>. Si pour l'instant la génétique a démontré qu'en physiologie la sérotonine centrale prend le pas sur la sérotonine périphérique, il n'existe pour l'instant aucune démonstration du résultat de la combinaison de l'action osseuse (périphérique + centrale) d'un traitement par antidépresseur ISRS.

## 2) Arguments en faveur d'une action centrale de la leptine

Le contrôle central de la masse osseuse par la leptine <sup>14, 64</sup> a fait l'objet de controverses scientifiques et a soulevé de nombreuses questions concernant les mécanismes d'action du système nerveux sympathique au niveau du tissu osseux. Une première controverse déjà mentionnée est l'effet osseux des  $\beta$ -bloquants. Une seconde controverse porte sur l'existence d'une action directe de la leptine sur les ostéoblastes sans passer par une régulation centrale de l'hypothalamus et du tonus sympathique. Un des éléments est la divergence de phénotype osseux entre celui observé chez les souris déficientes en leptine (*ob/ob*) et celui observé chez les souris déficientes en récepteur de leptine (*db/db*) <sup>22</sup>.

Les modalités d'actions en périphérie seraient que la leptine participerait en périphérie au maintien des cellules progénitrices mésenchymateuses dans un état indifférencié, favoriserait l'étape de minéralisation par les ostéoblastes matures et qu'elle aurait une action anabolique osseuse <sup>21, 22, 65-69, 1517</sup>.

Pour déchiffrer l'action centrale ou périphérique (ostéoblaste) de la leptine, des souris déficientes en récepteur de la leptine uniquement dans les neurones (*ObRb<sup>fl/fl</sup>; Synapsin 1 Cre*) et uniquement dans les ostéoblastes (*ObRb<sup>fl/fl</sup>;  $\alpha 1(I)Collagen Cre$* ) ont été générées. Les souris (*ObRb<sup>fl/fl</sup>; Synapsin 1 Cre*) ont le même phénotype de masse osseuse élevée que les souris *Ob/Ob* résultant d'une augmentation de formation (++) et de résorption osseuse (+) alors que la délétion dans les ostéoblastes (*ObRb<sup>fl/fl</sup>;  $\alpha 1(I)Collagen Cre$* ) n'a pas de phénotype osseux. Ceci montre que l'action de la leptine est centrale. De plus un modèle de récepteur de

leptine constitutivement actif dans tout l'organisme (souris l/l par mutation Y985L) permet de dissocier l'action osseuse de la leptine et celle sur l'appétit. Les souris l/l ont une diminution de leur formation osseuse indiquant que la leptine inhibe la masse osseuse<sup>70</sup>.

Le deuxième mode d'action de la leptine sur la masse osseuse passe par CART (Cocaïne and Amphetamine Regulated Transcript) qui est exprimé dans le cerveau (dont le noyau arqué de l'hypothalamus), l'hypophyse et les îlots pancréatiques. CART ne semble pas agir sur la masse osseuse comme un neuropeptide mais plutôt comme une hormone circulante modulant la résorption osseuse en freinant la production de RANKL par l'ostéoblaste. Pour l'instant le récepteur de CART n'a pas été identifié. Il n'est pas non plus encore établi si CART a une action directe ou indirecte sur l'ostéoblaste<sup>71,72</sup>.

### 3) Signalisation sympathique dans l'ostéoblaste

Concernant les mécanismes d'action du système nerveux sympathique au niveau du tissu osseux, une première réponse a été apportée par la génération de souris globalement déficientes en récepteurs bêta 2 adrénergiques (*Adrb2*<sup>-/-</sup>)<sup>71</sup>. Une réponse encore plus précise a été rapportée tout récemment avec la génération de souris déficientes spécifiquement dans les ostéoblastes en récepteur bêta 2 adrénergiques (*Adrb2*<sup>ob-/-</sup>)<sup>19</sup>. Ces deux lignées de souris déficientes en récepteur bêta 2 adrénergiques (global et seulement dans les ostéoblastes) présentent un phénotype de masse osseuse élevée. L'expérience d'injection intracérébroventriculaire de leptine chez ces souris n'affecte pas la masse osseuse indiquant que la voie de signalisation bêta 2 adrénergique dans l'ostéoblaste est nécessaire à l'action osseuse de la leptine. Ce travail a permis d'établir que la leptine contrôle au niveau de l'ostéoblaste les deux bras du remodelage osseux : l'ostéoformation et l'ostéorésorption.

Par la suite, l'utilisation de multiples souris transgéniques a permis de démontrer que les deux facteurs de transcription clé régulés par le système nerveux sympathique sont CREB et ATF4. CREB est le facteur de transcription impliqué dans le contrôle de la formation osseuse et notamment dans la prolifération des ostéoblastes en agissant sur *cMyc* qui agit secondairement sur les cyclines responsable du contrôle de la prolifération cellulaire<sup>73</sup>. L'activité de CREB (phosphorylation) est freinée par le tonus sympathique. Avec recul, CREB apparaît comme un facteur essentiel de régulation de la formation osseuse. Sur lui convergent l'action formatrice de la parathormone<sup>74</sup>, l'action inhibitrice de l'axe leptine/système nerveux sympathique<sup>19</sup> et l'action inhibitrice de la sérotonine digestive<sup>46</sup>.

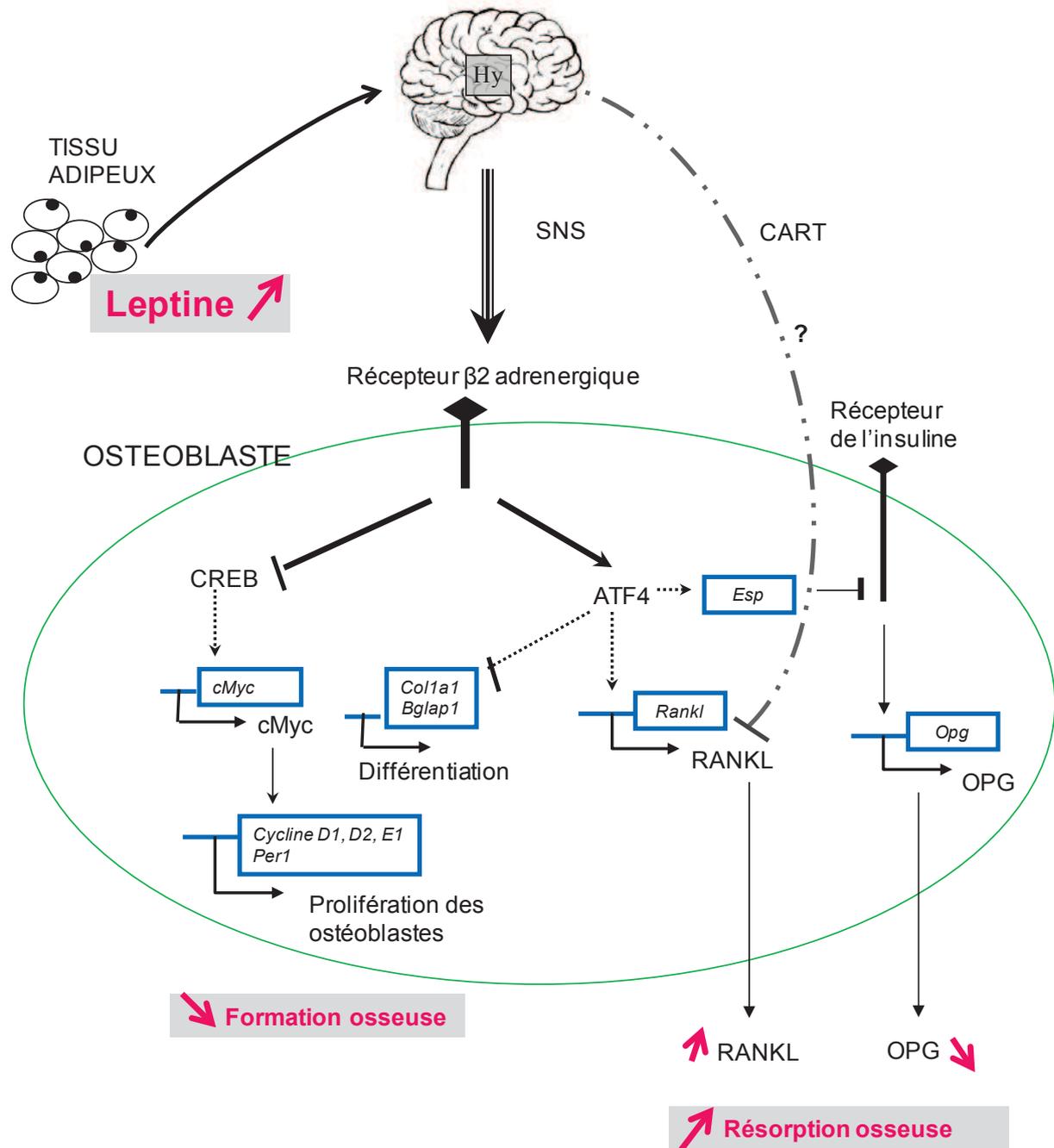
À l'inverse, ATF4 est le facteur de transcription dans l'ostéoblaste qui est impliqué dans le contrôle de la résorption osseuse. L'activité d'ATF4 est stimulée par le tonus sympathique. ATF4 à son tour augmente le ratio RankL/OPG (stimulation de *Rankl* et diminution d'*Opg*) ce qui stimule l'ostéoclastogenèse et la résorption osseuse<sup>71</sup>. En complément, ATF4 inhibe des gènes de différenciation ostéoblastique (*Col1a1*, *Bglap1*).

Ces travaux soulignent la dichotomie des deux facteurs de transcription contrôlés par le tonus sympathique pour diminuer la masse osseuse: CREB n'affecte

pas la différenciation ostéoclastique et ATF4 n'affecte pas la prolifération ostéoblastique<sup>19</sup>. Figure 5. On notera toutefois que ces expériences n'ont pas permis d'étudier l'action du système nerveux sympathique sur les ostéocytes.

La clarification de l'action du système nerveux sympathique au niveau de l'ostéoblaste pour réguler d'une part la formation et la résorption ouvre des perspectives thérapeutiques intéressantes chez les patientes présentant une masse osseuse basse. Ces résultats rejoignent ceux décrits par Bonnet *et al.* chez le rat<sup>28</sup> qui indiquent que des faibles doses de bêtabloquants suffisent pour prévenir la perte osseuse induite par l'ovariectomie. Dans cette étude les doses utilisées étaient trop faibles pour affecter le système cardio-vasculaire.

**Figure 5 :** contrôle central de la masse osseuse par la leptine. Le système nerveux sympathique au niveau de l'ostéoblaste bloque CREB et la prolifération des ostéoblastes et stimule ATF4 qui altère le ratio RankL/OPG et stimule la résorption osseuse <sup>75</sup>.



#### 4) Contrôle parasympathique de la masse osseuse

Etant donné l'importance de l'action du contrôle central de la masse osseuse par le système nerveux sympathique, il était logique de poser la question d'un éventuel phénotype osseux de l'autre acteur du système nerveux autonome : le système nerveux parasympathique (SNP).

Le principal neurotransmetteur du SNP est l'acétylcholine qui se lie aux récepteurs muscariniques couplés aux protéines G<sup>76, 77</sup>. On distingue 5 récepteurs muscariniques différents. M1R, M2R et M5R sont couplés à G<sub>q</sub> tandis que M2R et M4R sont couplés à Gi-Go. M3R est couplé à G<sub>q</sub> ce qui active la phospholipase C et l'augmentation de Ca<sup>++</sup> intracellulaire en bas de la cascade. L'étude du phénotype osseux des souris déficientes en récepteurs muscariniques montre que seul M3R a un phénotype osseux (M5R n'a pas été étudié). M3R est connu comme étant exprimé dans la partie latérale de l'hypothalamus, le cortex visuel et l'hippocampe<sup>78</sup>. Ces zones ne sont pas jusqu'à présent répertoriées dans le modèle du contrôle central de la masse osseuse. Dans ce travail, les hybridations in situ ont montré également une expression de *M3r* au niveau du raphé dorsal et du locus ceruleus<sup>79</sup>. En revanche, *M3r* n'est pas exprimé par le noyau VMH de l'hypothalamus ni par les ganglions parasympathiques. *M3r* est faiblement exprimé par les ostéoblastes.

Les souris déficientes en *M3r* spécifiquement dans les ostéoblastes (*M3r<sup>ob-/-</sup>*) n'ont pas de phénotype osseux. À l'inverse, les souris déficientes en *M3r* spécifiquement dans les neurones (*M3r<sup>ne-/-</sup>*) ont un phénotype osseux. Au niveau hormonal, ces souris ont une diminution de leur leptine sérique, de leur IGF-1 et de leur hormone de croissance (GH). Le cortisol n'est pas modifié. Cependant le phénotype semble indépendant des hormones pré-citées. L'action du système nerveux parasympathique semble être en fait centrale en modulant le tonus sympathique juste avant sa sortie du système nerveux dans le locus coeruleus. Ceci a été confirmé par la délétion d'un des récepteur bêta 2 adrénergique chez les souris *M3r<sup>-/-</sup>* (*M3r<sup>-/-</sup>; Adrβ2<sup>+/-</sup>*) qui suffit à corriger leur phénotype osseux et leur tonus sympathique. Cette expérience apporte la démonstration génétique que pour la régulation de la masse osseuse, le système nerveux parasympathique et le système nerveux sympathique sont dans la même cascade génétique.

Les souris *M3r<sup>-/-</sup>* n'ont pas de modification de la synthèse (expression normale de *Tph2*) ou du dosage de la sérotonine intracérébrale. L'absence de modification de la sérotonine oriente plutôt vers une action directement au niveau du locus coeruleus pour moduler le tonus sympathique.

En somme on retiendra que le système nerveux parasympathique (SNP) vient contrebalancer l'effet du système nerveux sympathique en augmentant la formation osseuse et en diminuant la résorption. L'action se fait directement au niveau du tronc cérébral (locus coeruleus) avant le départ des projections des neurones sympathiques en direction de la moelle (tractus intermedio lateralis dans la corne latérale)<sup>79</sup>.

## **Partie II : Régulation osseuse du métabolisme énergétique**

### **A/ L'ostéocalcine : une hormone active sur le métabolisme énergétique in vivo**

#### **I- Introduction**

Dans la première partie nous avons vu comment la leptine par son action cérébrale inhibait la formation osseuse de façon centrale et indirecte par l'intermédiaire du système nerveux sympathique<sup>9</sup>. Pour cela la leptine « *serre le frein du tonus sympathique* » c'est-à-dire qu'elle agit en bloquant l'action positive des neurones sérotoninergiques du tronc cérébral (raphé) dont les axones projettent sur le noyau VMH de l'hypothalamus qui contrôle à son tour le tonus sympathique.

Cette première partie indique que la graisse contrôle la masse osseuse ; autrement dit que le métabolisme énergétique régule la masse osseuse. Selon le raisonnement habituel en physiologie endocrinienne, lorsqu'un organe exerce une action sur un autre organe, il existe nécessairement un mécanisme de retour d'informations<sup>8</sup>. Ces mécanismes de boucles de rétrocontrôle négatif permettent le maintien de l'homéostasie et une réponse appropriée<sup>80</sup>. Ce raisonnement soulève la question de l'action de l'os sur le métabolisme énergétique.

#### **II- Hypothèse de travail**

Le squelette permet d'assurer la locomotion qui a été une fonction essentielle pour la survie de notre espèce tout au long de l'évolution. Pour assurer cette fonction, le squelette doit être capable de se réparer seul en cas de fracture et au quotidien d'absorber des charges d'intensité importante durant l'activité physique ou en des temps plus anciens lors de la recherche de nourriture, la fuite et le combat. Il apparaît dès lors crucial pour les vertébrés de maintenir une bonne qualité osseuse et des excellentes propriétés biomécaniques osseuses. Cette capacité de renouvellement constant pour réparer les micro- et macro-traumatismes et maintenir une bonne qualité osseuse passe par le remodelage osseux. Le remodelage osseux est un phénomène biphasique qui comprend d'abord la destruction de l'os préexistant par les ostéoclastes, c'est l'ostéorésorption, avant que de l'os nouveau soit formé par les ostéoblastes, c'est l'ostéoformation<sup>81-83</sup>. Chez l'adulte sain, la résorption et la formation osseuse sont en équilibre. A l'échelle du corps humain, le remodelage osseux apparaît comme une fonction homéostatique pour maintenir la masse osseuse et représente une fonction de survie. Comme toutes les fonctions homéostatiques<sup>8</sup>, il est contrôlé en partie par l'hypothalamus<sup>9</sup>.

Le remodelage osseux intervient simultanément en de multiples points du squelette et est un phénomène actif fortement consommateur d'énergie. Il serait

donc logique que le remodelage osseux puisse influencer le métabolisme énergétique en fonction de ses besoins. Dans ce travail, deux questions ont été posées : l'os exerce-t-il une action sur le métabolisme énergétique et si oui est-ce un contrôle hormonal ?

### III- Résumé de l'étude <sup>84</sup>

La recherche d'une telle hormone est partie d'une approche génétique pour déterminer quels étaient les gènes spécifiquement exprimés par les ostéoblastes. Une fois ces gènes identifiés, la stratégie fut de générer des souris déficientes pour ce gène et d'étudier si ces souris avaient un phénotype métabolique. Dans cette étude j'ai participé à la réalisation des tests métaboliques et aux analyses statistiques.

#### 1) Phénotype *Esp*<sup>-/-</sup> et souris surexprimant *Esp*

L'un des gènes identifiés a été *Esp* qui code pour une protéine appelée OST-PTP (=Ptpv). OST-PTP est une tyrosine phosphatase exprimée uniquement dans les ostéoblastes, les cellules ES et les cellules de Sertoli mais pas dans le pancréas ou les adipocytes. Les souris *Esp*<sup>-/-</sup> ont une mortalité périnatale anormalement élevée qui n'est pas liée à des anomalies squelettiques mais à des hypoglycémies sévères à la naissance avant toute ingestion de lait. Par la suite, la glycémie reste basse et s'accompagne d'une hyperinsulinémie. Les tests de tolérance au glucose et de sécrétion d'insuline après stimulation au glucose ont montré une augmentation considérable de la sécrétion d'insuline et de la tolérance au glucose des souris *Esp*<sup>-/-</sup>. L'analyse histologique du pancréas a révélé une augmentation de la taille et du nombre d'îlots de Langerhans, ainsi que de la prolifération des cellules  $\beta$ . Les souris *Esp*<sup>-/-</sup> se révélèrent aussi être plus sensibles à l'insuline tout en ayant moins de graisse viscérale. Cette insulinosensibilité vérifiée de multiples manières est paradoxale car l'augmentation de la sécrétion est habituellement cause d'une baisse de la sensibilité à l'insuline.

A l'inverse, l'hyperexpression d'*Esp* dans les ostéoblastes a montré une détérioration de la tolérance au glucose, de la sensibilité à l'insuline, du taux d'adiponectine, de la taille et du nombre des îlots de cellules  $\beta$  du pancréas.

Ce phénotype métabolique est fort puisque dans des conditions expérimentales visant à induire une obésité chez les souris soit par destruction des cellules  $\beta$  du pancréas avec de l'aurothioglucose (GTG) soit par un régime riche en graisses, les souris *Esp*<sup>-/-</sup> sont restées protégées de l'obésité et de l'intolérance au glucose.

En somme, ces résultats montrent qu'une protéine spécifique de l'ostéoblaste est capable de moduler le métabolisme énergétique du corps. Ils suggèrent qu'OST-PTP régulerait l'activité d'une molécule sécrétée par les ostéoblastes et active sur le métabolisme énergétique.

## 2) Les ostéoblastes sécrètent l'ostéocalcine, une hormone active sur le métabolisme énergétique

La coculture d'ostéoblastes matures sauvages et d'îlots de Langerhans augmente de 40% l'expression d'*insuline* tandis que des cellules proches des ostéoblastes telles que les fibroblastes n'ont pas d'effet. L'utilisation d'ostéoblastes *Esp*<sup>-/-</sup> matures stimule davantage encore l'expression d'*insuline*. L'expression du *glucagon* n'est pas modifiée. Selon le même schéma, la coculture d'adipocytes montre une stimulation d'*adiponectine*, deux fois plus importante avec les ostéoblastes *Esp*<sup>-/-</sup> que sauvages. Des résultats similaires ont été obtenus en cultivant des îlots ou des adipocytes en présence de milieux conditionnés d'ostéoblastes *Esp*<sup>-/-</sup> ou sauvages confirmant que les ostéoblastes sécrètent une hormone active sur le métabolisme énergétique.

Une protéine spécifique des ostéoblastes matures et susceptible de jouer ce rôle est l'ostéocalcine car il avait été noté précédemment lors de l'étude du phénotype osseux<sup>85</sup> que les souris déficientes en *ostéocalcine* (*Ocn*<sup>-/-</sup>) avaient une augmentation de leur graisse viscérale. L'étude du phénotype métabolique des souris *Ocn*<sup>-/-</sup> s'est révélé être un phénotype en miroir de celui des souris *Esp*<sup>-/-</sup> avec, comparativement aux sauvages, une glycémie à jeun plus élevée, une hypoinsulinémie, une détérioration de leur tolérance au glucose, de leur sensibilité à l'insuline et de leurs dépenses énergétiques. L'histologie et l'expression génique ont confirmé ce profil métabolique. En coculture, les ostéoblastes *Ocn*<sup>-/-</sup> ou les ostéoblastes immatures sont incapables d'augmenter l'expression d'*insuline* ou d'*adiponectine*. En revanche l'expression d'*insuline* ou d'*adiponectine* est augmentée en coculture avec des cellules COS produisant de l'ostéocalcine, ou simplement en cultures d'îlots ou d'adipocytes traitées par de l'ostéocalcine recombinante non carboxylée. Enfin, génétiquement, l'ablation d'un allèle d'*Ocn* chez des souris *Esp*<sup>-/-</sup> a permis de normaliser leur phénotype confirmant qu'OST-PTP et ostéocalcine appartiennent bien à une même voie génétique.

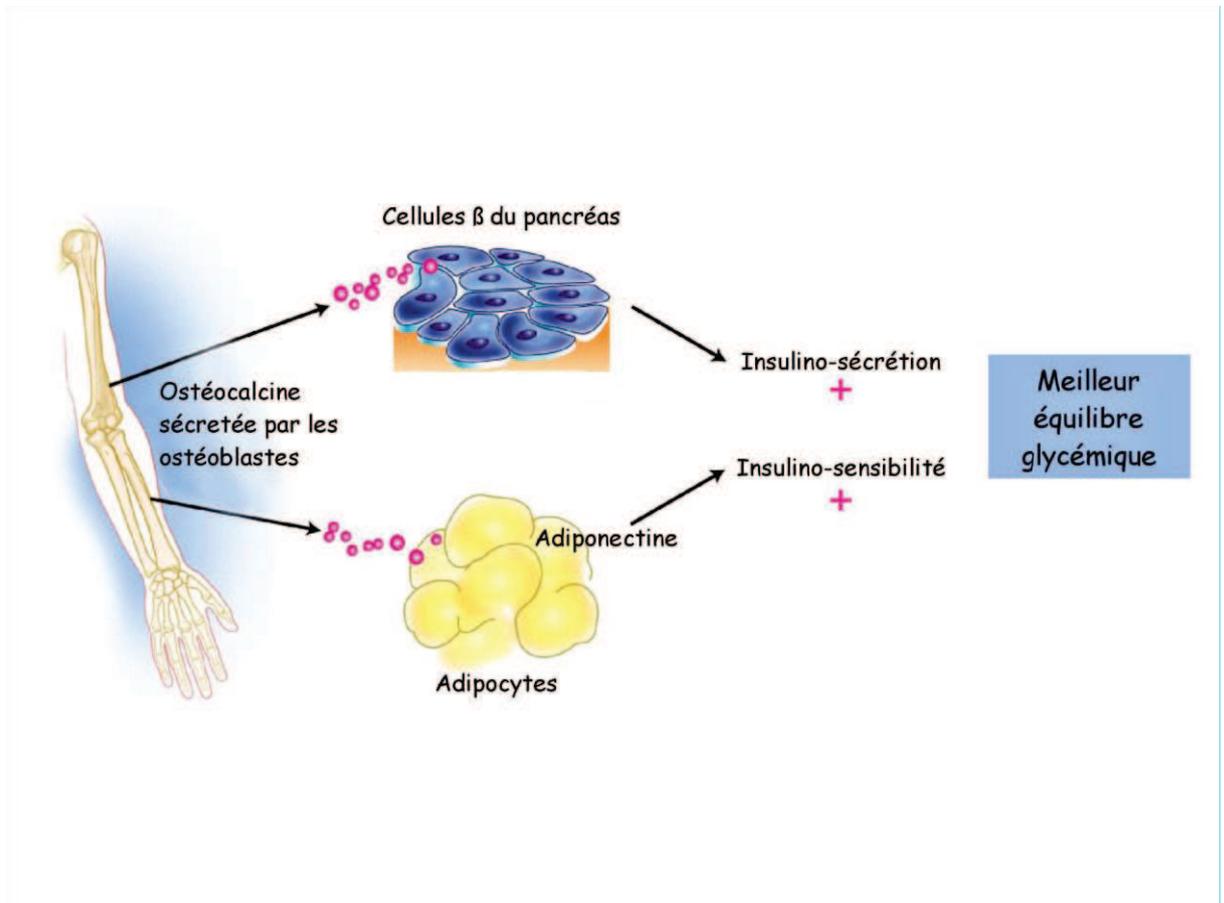
## 3) L'ostéocalcine module l'insulinosensibilité via l'adiponectine

Parmi les différentes adipokines connues, seule l'expression et le taux circulant d'adiponectine sont augmentés chez les souris *Esp*<sup>-/-</sup> et diminués chez les *Ocn*<sup>-/-</sup>. Chez les souris (*Ocn*<sup>+/-</sup>;*Adn*<sup>+/-</sup>), il existe une baisse importante de l'adiponectine sérique et de l'insulinosensibilité tandis que glycémie, insulinémie et insulinosécrétion sont normales. L'insulinosensibilité induite par l'ostéocalcine serait donc au moins en partie régulée par l'adiponectine.

### CONCLUSION

L'ostéocalcine non carboxylée est une hormone sécrétée par l'ostéoblaste. Elle stimule l'insulinosécrétion par son action sur le pancréas en favorisant la prolifération des cellules  $\beta$  et la sécrétion d'insuline. Elle stimule également l'insulinosensibilité des tissus cibles périphériques (muscle, foie, tissu adipeux) via son action sur les adipocytes en stimulant la sécrétion d'adiponectine. Figure 6.

**Figure 6 :** l'ostéocalcine est une hormone osseuse qui, régule le métabolisme énergétique en agissant simultanément sur l'insulinosécrétion et l'insulinosensibilité. Tiré de <sup>86</sup>.



#### **IV- Article <sup>84</sup>**

### **Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton.**

Lee NK, Sowa H, Hinoi E, Ferron M, Ahn JD, **Confavreux CB**, Dacquin R, Mee PJ, McKee M, Jung D, Zhang Z, Kim JK, Mauvais-Jarvis F, Ducy P, Karsenty G.

*Cell* 2007 Aug; 130(3): 456-69.

# Endocrine Regulation of Energy Metabolism by the Skeleton

Na Kyung Lee,<sup>1</sup> Hideaki Sowa,<sup>1</sup> Eiichi Hinoi,<sup>1</sup> Mathieu Ferron,<sup>1</sup> Jong Deok Ahn,<sup>3</sup> Cyrille Confavreux,<sup>1</sup> Romain Dacquin,<sup>4</sup> Patrick J. Mee,<sup>5</sup> Marc D. McKee,<sup>6</sup> Dae Young Jung,<sup>7</sup> Zhiyou Zhang,<sup>7</sup> Jason K. Kim,<sup>7</sup> Franck Mauvais-Jarvis,<sup>8</sup> Patricia Ducy,<sup>2</sup> and Gerard Karsenty<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Genetics & Development

<sup>2</sup>Department of Pathology

College of Physicians and Surgeons, Columbia University, New York, NY 10032, USA

<sup>3</sup>CHO-A Biotechnology Research Institute, CHO-A Pharm. Co., Seoul 143-701, Korea

<sup>4</sup>Ecole Normale Supérieure de Lyon, UMR5161, Laboratoire d'Endocrinologie Moléculaire et Différenciation Hématopoïétique et Osseuse, 69364 Lyon, France

<sup>5</sup>Centre for Stem Cell Research, University of Cambridge, Cambridge CB2 1TN, United Kingdom

<sup>6</sup>Faculty of Dentistry, and Department of Anatomy and Cell Biology, McGill University, Montreal, QC, Canada H3A 2B2

<sup>7</sup>Department of Cellular & Molecular Physiology, Penn State Medical Center, Hershey, PA 17033

<sup>8</sup>Department of Medicine, Northwestern University School of Medicine, Chicago, IL 60611, USA

\*Correspondence: gk2172@columbia.edu

DOI 10.1016/j.cell.2007.05.047

## SUMMARY

The regulation of bone remodeling by an adipocyte-derived hormone implies that bone may exert a feedback control of energy homeostasis. To test this hypothesis we looked for genes expressed in osteoblasts, encoding signaling molecules and affecting energy metabolism. We show here that mice lacking the protein tyrosine phosphatase OST-PTP are hypoglycemic and are protected from obesity and glucose intolerance because of an increase in  $\beta$ -cell proliferation, insulin secretion, and insulin sensitivity. In contrast, mice lacking the osteoblast-secreted molecule osteocalcin display decreased  $\beta$ -cell proliferation, glucose intolerance, and insulin resistance. Removing one *Osteocalcin* allele from OST-PTP-deficient mice corrects their metabolic phenotype. *Ex vivo*, osteocalcin can stimulate *CyclinD1* and *Insulin* expression in  $\beta$ -cells and *Adiponectin*, an insulin-sensitizing adipokine, in adipocytes; *in vivo* osteocalcin can improve glucose tolerance. By revealing that the skeleton exerts an endocrine regulation of sugar homeostasis this study expands the biological importance of this organ and our understanding of energy metabolism.

## INTRODUCTION

The prevailing paradigm in skeletal biology is that differentiation and functions of the two bone-specific cell types,

osteoblasts and osteoclasts, are determined by secreted molecules that can either be cytokines acting locally or hormones acting systemically (Harada and Rodan, 2003; Teitelbaum and Ross, 2003). A remarkable feature of most hormonal regulations is that they are controlled by feedback loops such that a cell type affected by a hormone sends signals influencing the hormone-producing cell. When applied to skeletal biology the concept of feedback regulation suggests that bone cells may exert an endocrine function.

Bone remodeling, the process whereby bones renew themselves, is regulated by multiple hormones. That obesity protects mammals from osteoporosis led us to propose that bone remodeling and energy metabolism could be regulated by the same hormone(s) (Ducy et al., 2000a). Verifying this hypothesis we showed that leptin, an adipocyte-derived hormone that appears during evolution with bony skeleton, is a major regulator of bone remodeling by acting on osteoblasts through two different neural pathways (Karsenty, 2006). Regardless of the molecular complexity of this novel neuroendocrine regulation, if indeed bone cells determine the level of activity of hormone-producing cells, then osteoblasts should affect energy metabolism.

Osteocalcin, one of the very few osteoblast-specific proteins, has several features of a hormone. It is, for instance, a cell-specific molecule, synthesized as a pre-molecule and secreted in the general circulation (Hauschka et al., 1989; Price, 1989). Because of their exquisite cell-specific expression the *Osteocalcin* genes have been intensively studied to identify osteoblast-specific transcription factors and to define molecular bases of bone physiology (Harada and Rodan, 2003). In the course of the latter study we generated *Osteocalcin*<sup>-/-</sup> mice (Ducy et al., 1996). While analyzing these mutant mice we noticed that they had an abnormal amount of

visceral fat (P.D. and G.K., unpublished data). This was the first evidence suggesting that skeleton may regulate energy metabolism.

Osteocalcin undergoes an unusual posttranslational modification whereby glutamic acid residues are carboxylated to form  $\gamma$ -carboxylglutamic acid (Gla) residues—hence its other name, bone Gla protein (Hauschka et al., 1989). Gla residues usually confer to proteins high affinity for mineral ions, yet loss- and gain-of-function experiments have failed to identify a function for osteocalcin in extracellular matrix mineralization in vivo (Ducy et al., 1996; Murshed et al., 2004). Thus at the present time the biological role, if any, of osteocalcin  $\gamma$ -carboxylation remains unknown.

A characteristic of osteoblasts is their paucity of cell-specific gene expression. We took advantage of this property and, with the goal of identifying osteoblast-enriched genes affecting energy metabolism, generated mutant mouse strains lacking genes encoding signaling molecules expressed only or preferentially in osteoblasts. Through this effort we inactivated, via classical means and in an osteoblast-specific manner, *Esp* (also known as *Ptprv*), a gene expressed in osteoblasts and Sertoli cells that encodes a receptor-like protein tyrosine phosphatase termed OST-PTP (Mauro et al., 1994). Remarkably, mice lacking *Esp* in osteoblasts only display an increase in  $\beta$ -cell proliferation, insulin secretion, and sensitivity that protects them from induced obesity and diabetes; all these phenotypes are corrected by deleting one allele of *Osteocalcin*. Accordingly, *Osteocalcin*<sup>-/-</sup> mice are glucose intolerant and fat; genetic and cell-based assays show that osteocalcin can favor proliferation of pancreatic  $\beta$ -cells, *Insulin*, and *Adiponectin* expression in  $\beta$ -cells and adipocytes. To our knowledge this study provides the first in vivo evidence that skeleton exerts an endocrine regulation of energy metabolism and thereby may contribute to the onset and severity of metabolic disorders.

## RESULTS

### Generation and Perinatal Lethality of *Esp*<sup>-/-</sup> Mouse Models

We further established that *Esp* expression was restricted to bone and testes by making use of a *LacZ* allele knocked into the *Esp* locus and performing in situ hybridization and real time PCR studies. All analyses verified that *Esp* is expressed in osteoblasts but not in  $\beta$ -cells of the pancreas or in adipocytes (Figures 1A, 1B, and S5A).

*Esp* was disrupted in a classical way (*Esp-nLacZ*; Dacquin et al., 2004) and in an osteoblast-specific manner (*Esp<sub>osb</sub>*<sup>-/-</sup>) by deleting exons encoding the phosphatase domain, using the *LoxP/Cre* recombinase technology (Figure S1A). Mice harboring *Esp* floxed alleles were crossed with  $\alpha 1(1)$  collagen-*Cre* mice (Dacquin et al., 2002) to generate osteoblast-specific *Esp*-deficient mice (*Esp<sub>osb</sub>*<sup>-/-</sup>; Figure S1B). Recombination occurred at high

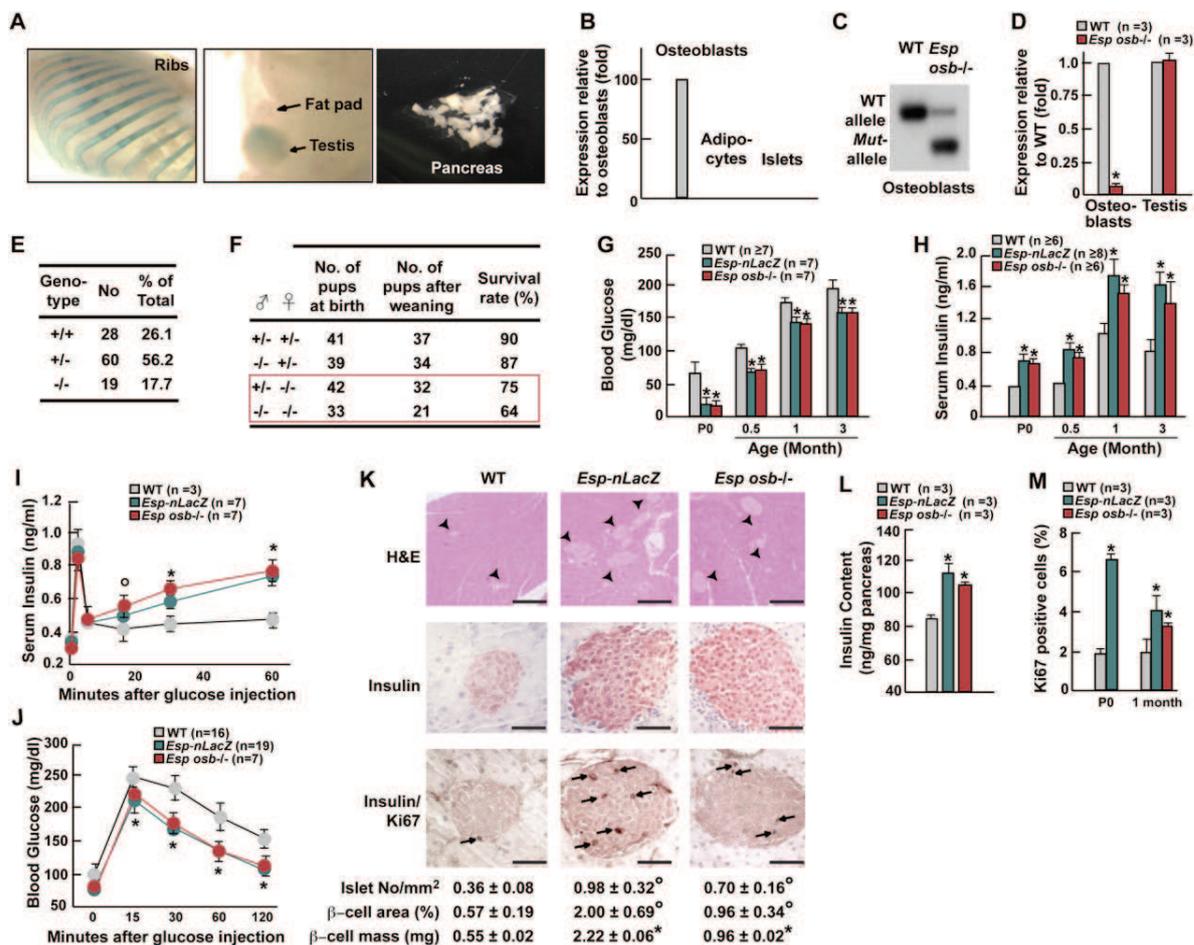
frequency at the *Esp* locus in osteoblasts. Accordingly, *Esp* expression was reduced nearly 90% in *Esp<sub>osb</sub>*<sup>-/-</sup> osteoblasts and unaffected in testes (Figures 1C and 1D). For the sake of clarity we will refer in the rest of the text to *Esp*<sup>-/-</sup> mice when both *Esp-nLacZ* and *Esp<sub>osb</sub>*<sup>-/-</sup> mice were studied.

When analyzed at weaning, intercrosses of *Esp*<sup>+/-</sup> mice never yielded more than 20% of *Esp*<sup>-/-</sup> pups although they were of normal appearance (Figures 1E, S1C, and S1D). Analysis of skeletal preparations of newborn wild-type (WT) and *Esp*<sup>-/-</sup> pups failed to detect any abnormality of skeletogenesis that could explain a perinatal lethality (Figures S1E and S1F). Thus, we asked whether *Esp*<sup>-/-</sup> pups' lethality could be due to a humoral abnormality. In that case mutant pups born from homozygous mutant mothers should die at a higher frequency than those born from heterozygous mothers. While lethality of *Esp*<sup>-/-</sup> pups born from *Esp*<sup>+/-</sup> mothers never reached 15%, up to 35% of *Esp*<sup>-/-</sup> pups born from *Esp*<sup>-/-</sup> mothers died before weaning (Figure 1F), indicating that *Esp*<sup>-/-</sup> pups' lethality was caused, at least in part, by a humoral abnormality.

### Increased $\beta$ -Cell Proliferation and Insulin Secretion in *Esp*<sup>-/-</sup> Mice

Regardless of genetic background, sex, and type of deletion performed, the only humoral abnormality observed in *Esp*<sup>-/-</sup> pups was a 3-fold reduction of blood glucose levels at birth before milk ingestion (Figure 1G). In some mutant pups this level was even too low to be detected. Blood glucose level remained abnormally low in adult *Esp*<sup>-/-</sup> mice after feeding (Figure 1G). Explaining this hypoglycemia there was a marked hyperinsulinemia in newborn and adult *Esp*<sup>-/-</sup> mice (Figure 1H). Serum level of C-peptide was also increased in *Esp*<sup>-/-</sup> mice (Figure S2A), while pancreas content and serum level of glucagon, a hormone secreted by pancreatic  $\alpha$ -cells in response to hypoglycemia, was normal in *Esp*<sup>-/-</sup> mice (Figure S2B). *Esp*<sup>-/-</sup> mice display a severe hyperinsulinemia, a feature that is known to inhibit glucagons secretion (Maruyama et al., 1984; Raju and Cryer, 2005) and that in all likelihood antagonized the increase in glucagon secretion that should have been triggered by their hypoglycemia. Serum levels of IGF-1 and PYY were similar in WT and *Esp*<sup>-/-</sup> mice. Surprisingly, serum levels of amylin, a protein synthesized by  $\beta$ -cells, was decreased 25% in mutant mice (Figures S2C–S2E).

The existence of an increase in insulin secretion in *Esp*<sup>-/-</sup> mice was demonstrated by intraperitoneal (IP) glucose-stimulated insulin secretion tests (GSIS, Figure 1I). To assess how this increase in insulin secretion affects the ability of the mice to dispose of a glucose load, we performed glucose tolerance tests following IP injection of glucose (2 g/kg of body weight) after an overnight fast (GTT). These tests revealed that *Esp*<sup>-/-</sup> mice had a significantly higher tolerance to glucose than WT mice (Figure 1J). Histological and immunochemical analyses showed an increase in pancreas insulin content, number



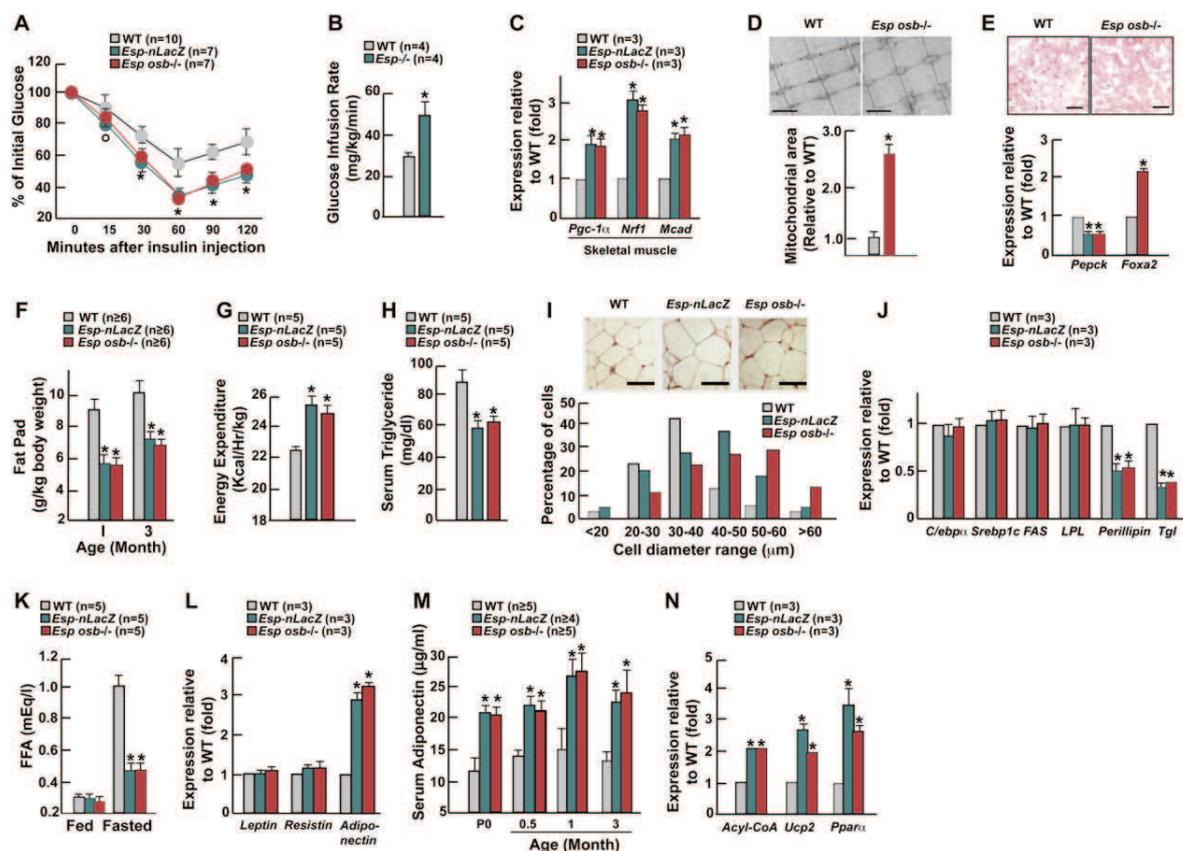
**Figure 1. Increased Insulin Secretion and β-Cell Proliferation in *Esp<sup>-/-</sup>* Mice**

(A) LacZ-stained tissues from newborn *Esp<sup>-/-</sup>* mice demonstrating *Esp* locus activity in bone and testis but not in pancreas or fat pads. (B) Expression of *Esp* in osteoblasts, adipocytes, and pancreatic islets by real-time PCR in 1-month-old mice. (C) Southern blot analysis showing efficient recombination at the *Esp* locus in osteoblasts of *Esp<sup>osb</sup><sup>-/-</sup>* mice. (D) Using real-time PCR *Esp* expression is 90% decreased in osteoblasts but not altered in testis of *Esp<sup>osb</sup><sup>-/-</sup>* mice. (E) Decreased percentage at weaning of *Esp<sup>-/-</sup>* pups born from crosses between *Esp<sup>+/-</sup>* mice. (F) Lower survival at birth and at weaning of *Esp<sup>-/-</sup>* pups born from crosses between *Esp<sup>+/-</sup>* and *Esp<sup>-/-</sup>* mothers. (G and H) Blood glucose levels (G) and serum insulin levels (H) in WT and *Esp<sup>-/-</sup>* newborn before feeding (P0) or after random feeding at indicated ages. (I–J) GSIS (I) and GTT (J) test in 1-month-old WT and *Esp<sup>-/-</sup>* mice. (K) H&E staining, insulin immunostaining, and insulin/Ki67 double immunostaining showing larger islets and increased β-cell proliferation in pancreas of WT and 1-month-old *Esp<sup>-/-</sup>* mice. Arrowheads indicate islets, and arrows point at Ki67-positive cells. Scale bars are 100 μm except in upper panels, where they are 800 μm. Histomorphometric comparisons of islet number, size, and β-cell mass between 1-month-old WT and *Esp<sup>-/-</sup>* mice (lowest panel). (L) Pancreas insulin content in 1-month-old WT and *Esp<sup>-/-</sup>* mice. (M) Quantification of the number of Ki67-immunoreactive cells in pancreatic islets of P5 and 1-month-old WT and *Esp<sup>-/-</sup>* mice. All panels except (I) and (J), <sup>o</sup>p < 0.05 and <sup>\*</sup>p < 0.01 versus WT (Student's t test). (I and J) <sup>o</sup>p < 0.05 versus WT and <sup>\*</sup>p ≤ 0.001 versus WT (ANOVA followed by post hoc analysis).

of islets, islet size, and β-cell mass in *Esp<sup>-/-</sup>* pancreas (Figures 1K and 1L). While TUNEL assay failed to detect any abnormal apoptosis, Ki67 immunostaining showed that β-cell proliferation was increased 60%–300% in 5-day-old (P5) and 1-month-old *Esp<sup>-/-</sup>* mice (data not shown; Figure 1M).

**Increased Insulin Sensitivity in *Esp<sup>-/-</sup>* Mice**

To determine whether the enhanced ability of *Esp<sup>-/-</sup>* mice to dispose of a glucose load was also caused by an increase in insulin sensitivity, we performed insulin tolerance tests (ITT). Despite their hyperinsulinemia insulin sensitivity was significantly increased in *Esp<sup>-/-</sup>* compared



**Figure 2. Increased Insulin Sensitivity and Adiponectin Expression in *Esp*<sup>-/-</sup> Mice**

All experiments compare 1-month-old mice WT and *Esp*<sup>-/-</sup> unless otherwise indicated.

(A) ITT.

(B) Glucose infusion rate during hyperinsulinemic-euglycemic clamp.

(C) Expression of markers of insulin sensitivity in skeletal muscle measured by real-time PCR.

(D) Electron microscopy images (upper panel, 20,000×) and corresponding quantification (lower panel) of mitochondrial area in gastrocnemius muscle. Scale bars are 1 μm.

(E) Decreased number of lipid droplets on Oil red O stained liver sections (upper panel) and modified expression of insulin target genes by real-time PCR (lower panel) in *Esp*<sup>osb-/-</sup> mice. Scale bars are 50 μm.

(F) Fat pad mass (fat pad weight over body weight).

(G) Energy expenditure.

(H) Serum triglyceride levels after an overnight fast.

(I) H&E staining of adipose tissues of WT and *Esp*<sup>-/-</sup> mice (upper panel) and respective distribution of diameters for 100 measured adipocytes per slide (lower panel). Scale bars are 50 μm.

(J) Expression of markers of adipogenesis, lipogenesis, fat uptake, and lipolysis in fat.

(K) Serum free fatty acid (FFA) in fed and overnight-fasted mice.

(L) Expression of *Leptin*, *Resistin*, and *Adiponectin* in fat.

(M) Serum levels of adiponectin in newborn mice before feeding (P0) and after random feeding at other indicated ages.

(N) Expression of adiponectin target genes in tissues of WT and *Esp*<sup>-/-</sup> mice.

In (A), \*p < 0.05 versus WT and \*p ≤ 0.001 versus WT (ANOVA followed by post hoc analysis); in (B)–(N), \*p < 0.01 versus WT (Student's t test).

to WT mice (Figure 2A). Hyperinsulinemic euglycemic clamps analysis verified the existence of an increase in insulin sensitivity by showing that steady-state glucose infusion rates were increased more than 50% in *Esp*<sup>-/-</sup> mice compared to WT littermates (Figure 2B). This was due to an increase in insulin-stimulated glucose uptake in muscle, brown and white fat, and in liver (Table S1).

We also performed molecular and morphological analyses in skeletal muscle and liver. Expression of *Pgc1α*, a target gene of insulin, and of *Nrf1* and *Mcad*, two target genes of *Pgc1α*, was significantly increased in *Esp*<sup>-/-</sup> compared to WT muscles (Figure 2C). These results suggested that mitochondrial activity was enhanced in absence of *Esp*. Consistent with this hypothesis mitochondrial area

was larger in *Esp*<sup>-/-</sup> than in WT muscles, while muscle mass over body mass ratio was normal (Figures 2D and S2F). In liver, expression of *Foxa2* was increased, while *Pepck* expression was decreased; fat content was also decreased in *Esp*<sup>-/-</sup> liver, a feature consistent with an increase in insulin sensitivity (Figure 2E). In all analyses *Esp*<sup>+/-</sup> mice behaved like WT littermates (data not shown).

Adult *Esp*<sup>-/-</sup> mice displayed another phenotype: their gonadal fat pads were significantly lighter than the ones of WT littermates despite being hyperinsulinemic (Figure 2F). This decrease in fat mass was restricted to visceral fat (Figure S2G). Contributing to explaining this phenotype, energy expenditure was increased in *Esp*<sup>-/-</sup> mice, while food intake was not affected (Figures 2G and S2H). Serum triglyceride levels were also lower in *Esp*<sup>-/-</sup> than in WT mice (Figure 2H). Although there were fewer adipocytes in *Esp*<sup>-/-</sup> than in WT mice (WT,  $93.2 \pm 10.7 \times 10^3$  adipocytes/fat pad [n = 5]; *Esp*<sup>-/-</sup>,  $37 \pm 5.1 \times 10^3$  adipocytes/fat pad [n = 3]) they were larger (Figure 2I). To understand this phenotype we studied expression of multiple molecular markers. *C/EBP $\alpha$* , *Srebp1c*, *Fatty acid synthase (Fas)*, and *Lipoprotein lipase (LPL)* were similarly expressed in *Esp*<sup>-/-</sup> and WT adipocytes, suggesting that adipogenesis, lipogenesis, and fat uptake were not affected by the mutation (Figure 2J). In contrast, expression of *Perilipin* and *Triglyceride lipase (Tgl)*, two lipolytic genes whose expression is inhibited by insulin, was markedly decreased in *Esp*<sup>-/-</sup> adipocytes (Figure 2J), indicating that lipolysis is inhibited in *Esp*<sup>-/-</sup> mice. Accordingly, serum level of free fatty acid did not increase following an overnight fast in *Esp*<sup>-/-</sup> mice as it did in WT littermates (Figure 2K). There was no inflammation in fat since *Tnf $\alpha$*  and *IL-6* expression and serum levels were low in *Esp*<sup>-/-</sup> mice (Figures S2I and S2J).

#### Increased Adiponectin Expression in *Esp*<sup>-/-</sup> Mice

To uncover the mechanism leading to an increase in insulin sensitivity in *Esp*<sup>-/-</sup> mice we studied various adipokines. Expression and serum levels of resistin, an adipokine mediating insulin resistance, were virtually not affected by *Esp* deletion; the same was true for leptin, an insulin-sensitizing hormone (Friedman and Halaas, 1998; Steppan et al., 2001; Figures 2L and S2K). On the other hand, expression and serum level of adiponectin, an adipokine enhancing insulin sensitivity (Yamauchi et al., 2001), were respectively increased 3- and 2-fold in *Esp*<sup>-/-</sup> mice (Figures 2L and 2M). Accordingly, expression of the adiponectin target genes *Acyl-CoA Oxidase*, *Ppar $\alpha$* , and *Ucp2* was increased in *Esp*<sup>-/-</sup> mice (Figure 2N; Kadowaki and Yamauchi, 2005).

In summary, *Esp* inactivation causes hypoglycemia with decreased adiposity as a result of increased pancreatic  $\beta$ -cell proliferation, enhanced insulin secretion, and improved insulin sensitivity. That these abnormalities were observed both in *Esp-nLacZ*<sup>-/-</sup> and *Esp<sub>osb</sub>*<sup>-/-</sup> mice demonstrates that osteoblasts regulate glucose homeostasis.

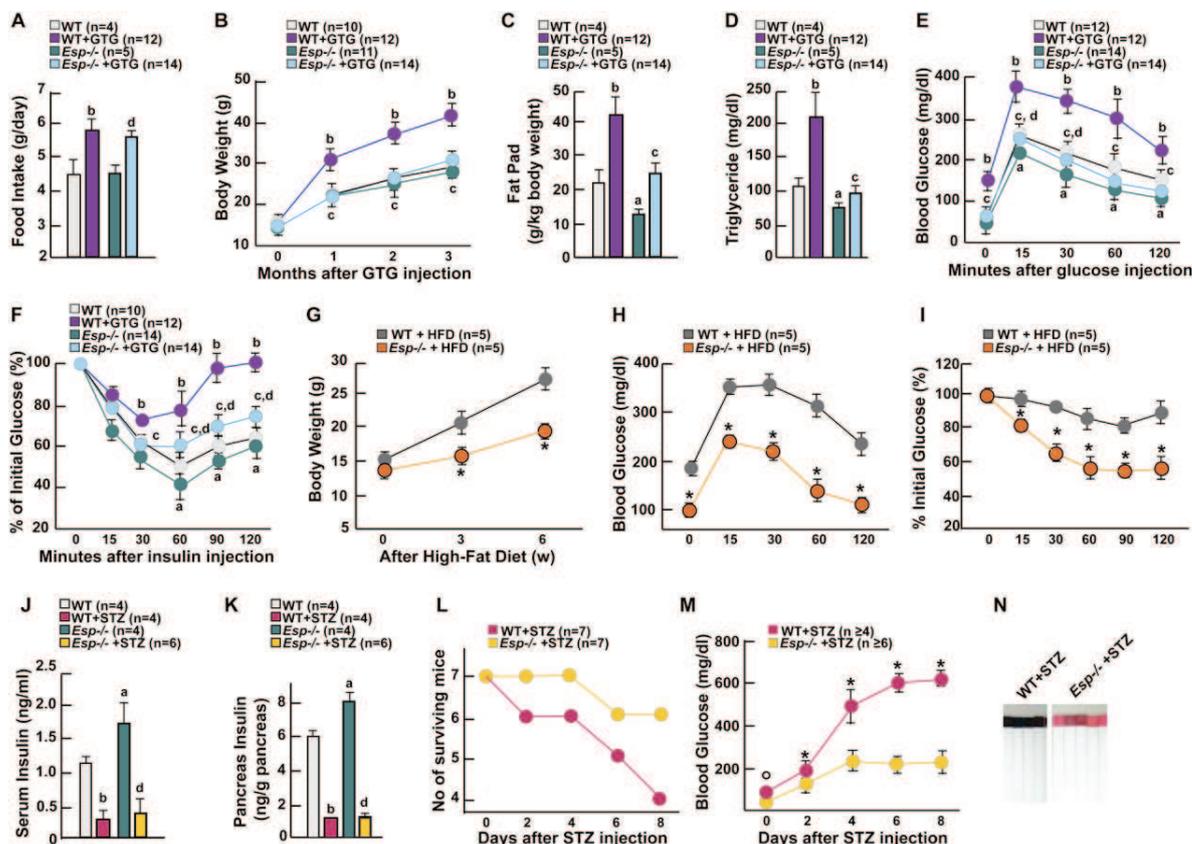
#### *Esp*<sup>-/-</sup> Mice Are Protected from Obesity and Glucose Intolerance

The increase in insulin secretion and sensitivity characterizing *Esp*<sup>-/-</sup> mice raised the prospect that these mutant mice could be protected from obesity and diabetes. Because *Esp-nLacZ*<sup>-/-</sup> and *Esp<sub>osb</sub>*<sup>-/-</sup> show identical metabolic and molecular abnormalities, we tested this hypothesis in *Esp-nLacZ*<sup>-/-</sup> mice only. Three different assays were used.

First, we injected gold thioglucose (GTG) in 1-month-old mice to lesion the ventromedial hypothalamus (Brecher et al., 1965). GTG induced ventromedial hypothalamic lesions (Figure S3) and hyperphagia (Figure 3A) in both WT and *Esp*<sup>-/-</sup> mice. When analyzed 3 months after injection GTG-treated WT mice were obese, glucose intolerant, and insulin resistant, and their serum triglyceride levels were also significantly increased (Figures 3B–3F). In contrast, GTG-treated *Esp*<sup>-/-</sup> mice remained lean, had fat pad mass and serum triglyceride levels similar to the ones of PBS-treated WT mice, and displayed no evidence of glucose intolerance or of insulin insensitivity (Figures 3B–3F). Second, we fed WT and *Esp*<sup>-/-</sup> mice a high fat diet (HFD) for 6 weeks. As shown in Figures 3G–3I, *Esp*<sup>-/-</sup> fed a HFD gained significantly less weight than WT mice and did not develop glucose intolerance or insulin resistance as WT mice did. Third, we asked whether the increase in insulin sensitivity could protect *Esp*<sup>-/-</sup> mice from pancreatic  $\beta$ -cell failure. To that end we injected mice with streptozotocin (STZ) to provoke oxidative stress in  $\beta$ -cells and cell death (Le May et al., 2006). STZ markedly decreased pancreas insulin content and insulin serum level in both genotypes (Figures 3J and 3K). Eight days after STZ injection three of the seven STZ-treated WT mice had died, and all the surviving ones had serum glucose levels above 500 mg/dl (Figures 3L and 3M). On the other hand, only one STZ-treated *Esp*<sup>-/-</sup> mouse died during this period, and blood glucose level of the surviving ones did not exceed 250 mg/dl. Unlike what was the case for STZ-treated WT mice, glucose could not be detected in urine of STZ-injected *Esp*<sup>-/-</sup> mice (Figure 3N). Since both STZ-treated WT and *Esp*<sup>-/-</sup> mice had a similar decrease in islets' insulin content the absence of an overt diabetic phenotype in STZ-treated *Esp*<sup>-/-</sup> mice suggests that their increase in insulin sensitivity protected them from diabetes. Results of these three experiments establish that *Esp* function is required for the development of obesity and glucose intolerance in mice.

#### *Esp* Influences the Bioactivity of Osteoblast-Secreted Molecule(s)

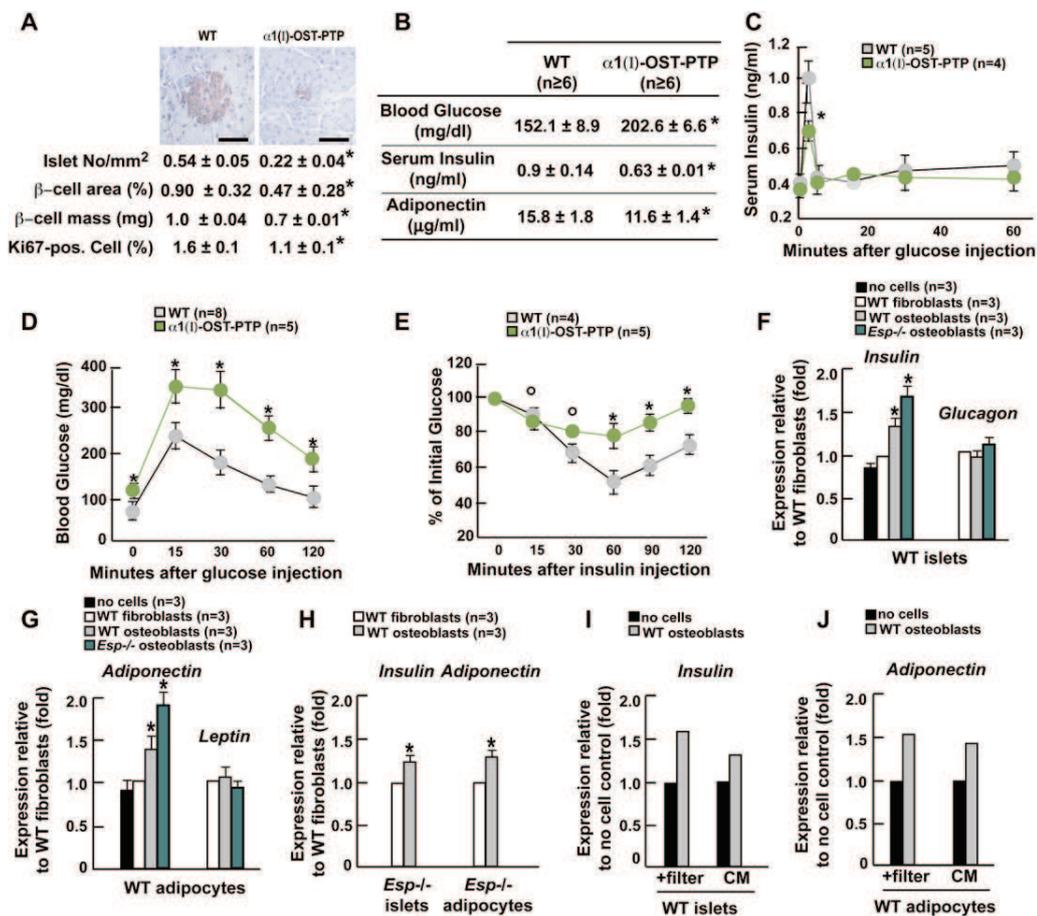
To further establish that it is through its osteoblastic expression that *Esp* regulates glucose metabolism we next relied on gain-of-function experiments. Transgenic mice overexpressing full-length *Esp* cDNA selectively in osteoblasts ( $\alpha 1(I)$ -*Esp* mice) displayed decreased  $\beta$ -cell proliferation, lower  $\beta$ -cell mass, and hypoinsulinemia in the fed state and showed impaired insulin secretion in response to glucose (Figures 4A–4C). They also showed lower



adiponectin serum concentrations (Figure 4B). As a result,  $\alpha 1(I)$ -*Esp* mice on a regular chow developed hyperglycemia, glucose intolerance, and insulin resistance (Figures 4B, 4D, and 4E). That it is observed in mice overexpressing *Esp* in osteoblasts supports the notion that OST-PTP regulates the bioactivity of an osteoblast-derived secreted molecule regulating glucose homeostasis. That it is only observed in transgenic mice overexpressing full-length *Esp* suggests that the phosphatase activity of OST-PTP is required to affect glucose homeostasis.

Next we cocultured osteoblasts, which are adherent cells, with either pancreatic islets or adipocytes, which are not adherent. Coculture of differentiated WT osteoblasts with islets isolated from WT mice increased *Insulin* expression 40% (Figure 4F). This enhancement of *Insulin* expression by osteoblasts was specific since fibroblasts

did not have this ability. In agreement with the increase in insulin secretion observed in *Esp*<sup>-/-</sup> mice, *Esp*<sup>-/-</sup> osteoblasts enhanced *Insulin* expression to a higher extent than WT osteoblasts (Figure 4F). Expression of *Glucagon*, a gene expressed in a different cell type in the islets, was not affected by osteoblasts (Figure 4F), further suggesting that *Glucagon* expression is not affected by *Esp* inactivation. We also cocultured osteoblasts or fibroblasts with adipocytes. WT osteoblasts, but not fibroblasts, increased expression of *Adiponectin*, and *Esp*<sup>-/-</sup> osteoblasts were 2-fold more potent in this action; *Adiponectin* was the only tested adipokine whose expression was affected (Figure 4G). Control experiments using WT osteoblasts cocultured with *Esp*<sup>-/-</sup> islets or adipocytes showed the same increase in *Insulin* and *Adiponectin* expression than when using WT islets or adipocytes (Figure 4H).



**Figure 4. Osteoblasts Secrete a Factor Regulating *Insulin* and *Adiponectin* Expression**

(A–E) All experiments compare 1-month-old WT and  $\alpha 1(I)$ -*Esp* mice. (A) Insulin immunostaining (upper panel) and histomorphometric comparisons of islet number, size,  $\beta$ -cell mass, and Ki67-immunoreactive cells in pancreas (lower panel). Scale bars are 100  $\mu$ m. (B) Blood glucose and serum insulin/adiponectin levels. (C) GSIS test. (D) GTT. (E) ITT.

(F) Expression of *Insulin* and *Glucagon* in WT islets cocultured with fibroblasts or osteoblasts.

(G) Expression of *Adiponectin* and *Leptin* in WT adipocytes cocultured with fibroblasts or osteoblasts.

(H) Expression of *Insulin* and *Adiponectin* in *Esp*<sup>-/-</sup> indicated cells cocultured with fibroblasts or osteoblasts.

(I and J) Expression of *Insulin* (I) and *Adiponectin* (J) in WT indicated cells cocultured with or without osteoblasts in presence of a filter preventing cell-cell contact or in presence of conditioned medium (CM) collected from osteoblast cultures. (A, B, and F–J) \*p < 0.05 versus WT (Student's t test); (C–E) °p < 0.05 versus WT and \*p ≤ 0.001 versus WT (ANOVA).

Study of *Leptin* and *Adiponectin* expression in osteoblasts and of osteoblast markers in adipocytes did not detect misexpression of any of these genes at the end of this experiment and thus excluded a transdifferentiation event (Figures S4A–S4D).

To establish that the regulation of *Insulin* and *Adiponectin* expression by osteoblasts occurs via the release of secreted molecule(s) we first cocultured osteoblasts with either islets or adipocytes using a filter preventing cell-cell contact. Second, islets and adipocytes were cultured in the presence of supernatant of osteoblast cultures. In both cases we observed a significant increase in *Insulin* and *Adiponectin* expression (Figures 4I and 4J).

### The Osteoblast-Secreted Molecule Osteocalcin Favors $\beta$ -Cell Proliferation, Insulin Secretion, and Sensitivity

In search of osteoblast-specific secreted molecule(s) regulating glucose homeostasis under the control of *Esp* we focused our attention on mice lacking osteocalcin (*Ocn*<sup>-/-</sup> mice) since we noticed upon their generation that they were abnormally fat.

*Ocn*<sup>-/-</sup> mice had higher blood glucose level and lower insulin serum level than WT mice (Figures 5A and 5B). Insulin secretion and sensitivity as well as glucose tolerance analyzed by GSIS, GTT, ITT, and hyperinsulinemic euglycemic clamps were all decreased in *Ocn*<sup>-/-</sup> mice, as was

energy expenditure (Figures 5C–5G; Table S1). Expression of insulin target genes was decreased in skeletal muscle and liver, while *Pepck* expression was increased (Figure 5H). Islets' size and number,  $\beta$ -cell mass, pancreas insulin content, and insulin immunoreactivity were all markedly decreased in *Ocn*<sup>-/-</sup> mice (Figure 5I).  $\beta$ -cell proliferation measured by Ki67 immunostaining was decreased 2-fold in *Ocn*<sup>-/-</sup> pancreas (Figure 5I). There was also in *Ocn*<sup>-/-</sup> mice an increase in fat mass, adipocytes number (WT,  $93.2 \pm 10.7 \times 10^3$  adipocytes/fat pad [n = 5], *Ocn*<sup>-/-</sup>,  $125.6 \pm 10.6 \times 10^3$  adipocytes/fat pad [n = 3]), and serum triglyceride levels (Figures 5J and 5K). *Adiponectin* expression and serum levels were significantly lower in *Ocn*<sup>-/-</sup> than in WT mice, while expression of other adipokines was not affected (Figures 5L and 5M). Expression of molecular targets of adiponectin action was decreased in *Ocn*<sup>-/-</sup> mice (Figure 5N). *Ocn*<sup>+/-</sup> mice were indistinguishable from WT littermates (Figures 7A–7G). All these abnormalities were observed in mice fed a normal diet. We verified that *Osteocalcin* was not expressed in islets or adipocytes (Figures S5A and S5B).

In coculture assays, *Ocn*<sup>-/-</sup> osteoblasts could not enhance expression of *Insulin* and *Adiponectin* (Figures 5O and 5P). Likewise, WT immature osteoblasts that do not express *Osteocalcin* (Ducy et al., 2000b) could not induce *Insulin* or *Adiponectin* expression (Figure 5R). In contrast, forced expression of *Osteocalcin* in COS cells allowed these cells to enhance *Insulin* and *Adiponectin* expression (Figure 5Q). We also added bacterially produced recombinant osteocalcin (3 ng/ml, Figure S6C) to a coculture of WT fibroblasts and  $\beta$ -cells and observed an induction of *Insulin* expression, a phenomenon that fibroblasts could not trigger otherwise (Figure 5R).

To add further credence to these cell-based results we tested whether recombinant osteocalcin could affect glucose metabolism in vivo. To that end *Ocn*<sup>-/-</sup> mice were subjected to a GTT in which half the mice received glucose alone while the other half received glucose and recombinant osteocalcin (20 ng). Osteocalcin significantly decreased blood glucose levels at the 30, 60, and 120 min time points of this assay (Figure 5S). Osteocalcin also increased insulin secretion in *Ocn*<sup>-/-</sup> mice in a GSIS test setting (Figure 5T). These experiments are consistent with the notion that osteocalcin is a molecule secreted by osteoblasts that can increase *Insulin* and *Adiponectin* expression.

### Osteocalcin Regulates Insulin Sensitivity through Adiponectin

To determine whether insulin and adiponectin both contribute to the metabolic phenotype of the *Ocn*<sup>-/-</sup> mice we asked two related questions. Does osteocalcin regulate *Adiponectin* expression independently of its action on insulin secretion? And if it is the case, does the decrease in *Adiponectin* expression noted in *Ocn*<sup>-/-</sup> mice explain their decrease in insulin sensitivity? To address these questions we generated compound heterozygote *Ocn*<sup>+/-</sup>;*Adiponectin*(*Adipo*)<sup>+/-</sup> mice. Insulin sensitivity was markedly decreased in these mice, while blood glu-

cose levels, insulin serum levels, and insulin secretion as determined by GSIS remained within the normal range (Figures 6A–6D). Adiponectin serum levels were also significantly decreased in *Ocn*<sup>+/-</sup>;*Adipo*<sup>+/-</sup> compared to WT or single heterozygote mice (Figure 6E). These observations are consistent with the hypothesis that osteocalcin regulates insulin sensitivity independently of its effect on insulin secretion and that this regulation of insulin sensitivity occurs, at least in part, through adiponectin.

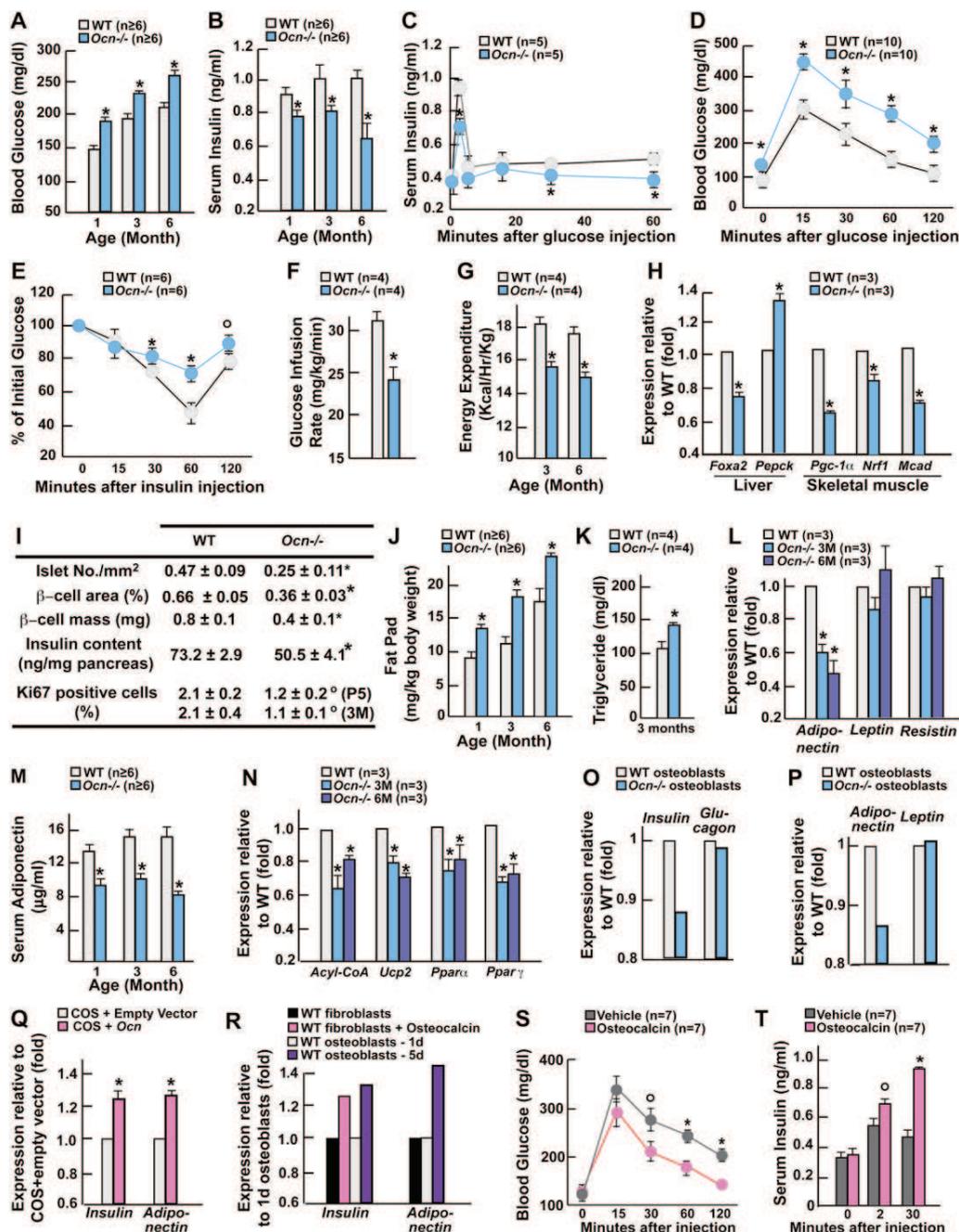
### OST-PTP Regulates Osteocalcin Bioactivity

The metabolic phenotype of *Ocn*<sup>-/-</sup> mice is the mirror image of the one observed in *Esp*<sup>-/-</sup> mice, suggesting that in the latter there is a gain of osteocalcin activity. If this is the case then metabolic abnormalities of *Esp*<sup>-/-</sup> mice should be corrected by reducing *Osteocalcin* expression. Indeed, *Esp*<sup>-/-</sup> mice lacking one allele of *Osteocalcin* showed a remarkable reversal of all their metabolic abnormalities (Figures 7A–7F). In addition, Ki67 staining showed that  $\beta$ -cell proliferation was also reduced in these mutant mice (Figure 7G). *Osteocalcin* expression and serum levels were normal in *Esp*<sup>-/-</sup> mice, thus ruling out that OST-PTP regulates *Osteocalcin* expression (Figures S6A and S6B). These results provide genetic evidence that *Esp* and *Osteocalcin* lie in the same regulatory pathway and infer that *Esp*<sup>-/-</sup> mice metabolic phenotype is caused by a gain-of-activity of this hormone.

Is the level of  $\gamma$ -carboxylation, the main posttranslational modification of osteocalcin, different in WT and *Esp*<sup>-/-</sup> mice? Carboxylated osteocalcin has a higher affinity for hydroxyapatite (HA) than uncarboxylated osteocalcin (Hauschka et al., 1989; Price, 1989). As shown in Figure 7H following a 15 min incubation period, 90% of osteocalcin present in the serum of WT mice was bound to HA, whereas only 74% was present using serum from *Esp*<sup>-/-</sup> mice. This experiment suggested that OST-PTP influences osteocalcin function by regulating its degree of  $\gamma$ -carboxylation and that it was the uncarboxylated form of osteocalcin that regulates glucose homeostasis. To test this latter hypothesis we performed two additional experiments. First, WT osteoblasts were treated with warfarin, an inhibitor of  $\gamma$ -carboxylation (Berkner, 2005) prior to and during coculture assays. This treatment resulted in a marked decrease in the percentage of osteocalcin bound to HA (Figure 7J), and warfarin-treated osteoblasts induced *Adiponectin* expression to a significantly higher extent than vehicle-treated osteoblasts (Figure 7K). Second, we used carboxylated osteocalcin and bacterially produced, and therefore uncarboxylated, osteocalcin (Figure S6C) in cell-based assays. Only uncarboxylated osteocalcin could induce expression of *Adiponectin* in adipocytes, and of *Insulin* and *CyclinD1*, a molecular marker of cell proliferation, in islets (Kushner et al., 2005; Figures 7K and 7L).

### DISCUSSION

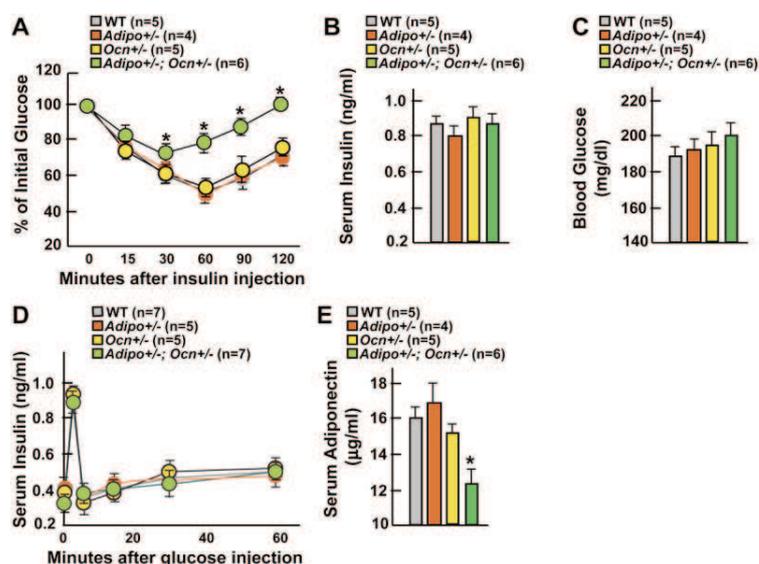
The results presented in this study uncover a novel pathway taking place in osteoblasts and resulting in the



**Figure 5. Osteocalcin Regulates β-Cell Proliferation, Insulin Secretion, and Insulin Sensitivity**

All experiments compare 3-month-old WT and *Ocn*<sup>-/-</sup> mice unless otherwise indicated.

- (A) Blood glucose levels after random feeding.
- (B) Insulin levels.
- (C) GSIS test.
- (D) GTT.
- (E) ITT.
- (F) Glucose infusion rate during hyperinsulinemic-euglycemic clamp.
- (G) Energy expenditure.
- (H) Expression of insulin target genes by real-time PCR.
- (I) Histomorphometric comparisons of islet numbers, islet size, β-cell mass, insulin content in pancreas, and Ki67 immunoreactive cells in pancreatic islets. P5, 5-day-old pups; 3M, 3-month-old mice.



**Figure 6. Osteocalcin Regulates Insulin Sensitivity via Adiponectin**

(A–E) Comparison between 6-week-old WT, *Adiponectin*<sup>+/-</sup> (*Adipo*<sup>+/-</sup>), *Osteocalcin*<sup>+/-</sup> (*Ocn*<sup>+/-</sup>), and *Ocn*<sup>+/-</sup>; *Adipo*<sup>+/-</sup> mice. (A) ITT. (B) Insulin serum levels. (C) Blood glucose levels. (D) GSIS test. (E) Adiponectin serum levels. In (A) and (D), \**p* ≤ 0.001 versus WT (ANOVA followed by post hoc analysis); in (B), (C), and (E), \**p* < 0.05 versus WT (Student's *t* test).

secretion of a hormone improving glucose homeostasis. Our results expand the spectrum of functions of skeleton, add further credence to the concept that bone and energy metabolisms regulate each other (Ducy et al., 2000a), and also suggest that the pathogenesis of some degenerative diseases of energy metabolism may be more complex than anticipated.

#### Mouse Genetic to Reveal Novel Crosstalk between Organs

Genetic manipulation in mice has been a powerful tool to reach a better understanding of vertebrate physiology. It has been shown repeatedly for instance that organs not known to exert any regulatory influences were in fact fulfilling important endocrine functions. This is the case for instance of fat through the secretion of adipokines, of liver through bile acids, and of vascular smooth muscle cells through synthesis of Emilin, a regulator of blood pressure (Spiegelman and Flier, 2001; Watanabe et al., 2006; Zaccagna et al., 2006). This genetic approach to whole animal physiology had unforeseen consequences. For instance, it linked together organs not thought previously to affect each other and also showed that we do not know all the functions of most major organs. This is the case for skeleton.

#### Osteoblasts' Regulation of $\beta$ -Cell and Adipocyte Biology

That adipocytes regulate bone mass by acting on osteoblasts suggested that osteoblasts may affect adipocyte biology (Ducy et al., 2000a). Several observations reported here demonstrate that, indeed, osteoblasts secrete hormones influencing energy metabolism, albeit in unanticipated, yet important, manners. For instance, *Esp* deletion in osteoblasts results in an increase in  $\beta$ -cell proliferation; given the current emphasis on the stimulation of  $\beta$ -cell proliferation this function of osteoblasts is of great potential from a therapeutic point of view. WT and even more so *Esp*<sup>-/-</sup> osteoblasts can enhance *Insulin* expression within a short time in isolated islets, indicating that this function occurs independently of their ability to promote cell proliferation. Paradoxically given their effect on insulin secretion, WT and even more so *Esp*<sup>-/-</sup> osteoblasts enhance expression in adipocytes of *Adiponectin*, an adipokine whose overexpression enhances *Insulin* sensitivity (Otabe et al., 2007). This in turn explains why *Esp*<sup>-/-</sup> mice have an increase in insulin sensitivity. Thus, all metabolic functions of the osteoblasts described here tend to improve glucose handling in vivo. It has been proposed that *Esp* is a pseudogene in human (Cousin et al., 2004). However, two close homologs of *Esp* are

(J) Fat pad mass (fat pad weight over body weight).

(K) Serum triglyceride levels after an overnight fast.

(L and M) serum levels (L) and gene expression (M) of adiponectin.

(N) Expression of adiponectin target genes by real-time PCR.

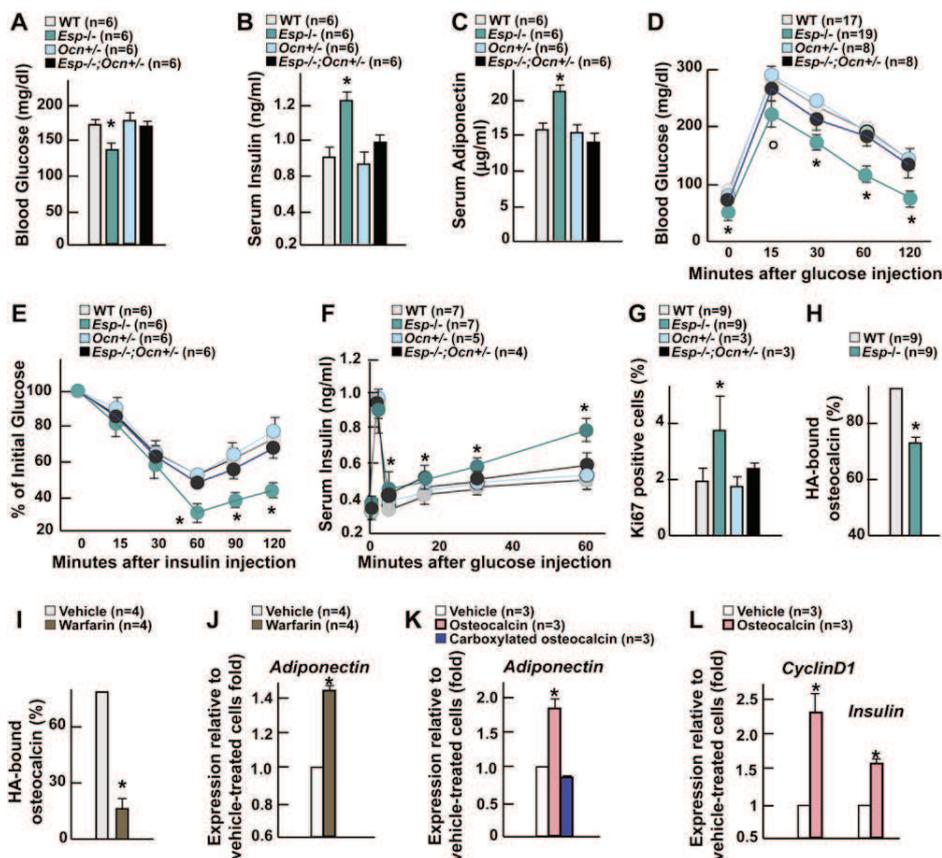
(O) Expression of *Insulin* and *Glucagon* in WT pancreatic islets cocultured with osteoblasts of indicated genotypes.

(P) Expression of *Adiponectin* and *Leptin* in WT adipocytes cocultured with osteoblasts of indicated genotypes.

(Q) Expression of *Insulin* and *Adiponectin* in WT indicated cells cultured in presence of conditioned media from COS cells transfected with an *Osteocalcin* expression vector or its empty counterpart.

(R) Expression of *Insulin* and *Adiponectin* in WT islets and adipocytes cocultured with fibroblasts in presence of recombinant osteocalcin (0.3 ng/ml) or vehicle or with osteoblasts expressing (5 days) or not (1 day) *Osteocalcin*.

(S and T) Dynamic of glucose (S) and insulin levels (T) in *Ocn*<sup>-/-</sup> mice injected simultaneously with glucose and 20 ng of recombinant osteocalcin or vehicle. (A, B, and F–R) \**p* < 0.05 versus WT (Student's *t* test); (C–E, S, and T) °*p* ≤ 0.01 versus WT and \**p* ≤ 0.001 versus WT (ANOVA).



**Figure 7. *Esp*<sup>-/-</sup> Mice Are a Model of Increased Osteocalcin Bioactivity**

(A–G) Comparison between 6-week-old WT, *Esp*<sup>-/-</sup>, *Ocn*<sup>+/-</sup>, and *Esp*<sup>-/-</sup>;*Ocn*<sup>+/-</sup> mice. (A) Blood glucose levels. (B) Serum insulin levels. (C) Serum adiponectin levels. (D) GTT. (E) ITT. (F) GSIS test. (G) Quantification of the number of Ki67-immunoreactive cells in pancreatic islets. (H and I) Quantification of the percentage of osteocalcin bound to hydroxyapatite (HA) resin after a 15 min incubation of serum of 1-month-old mice of indicated genotypes (H) or of conditioned medium from osteoblast cultures treated with warfarin or vehicle (I). (J) Expression of *Adiponectin* in WT adipocytes cocultured with osteoblasts treated with warfarin or vehicle. (K) Expression of *Adiponectin* in WT adipocytes cultured in presence of vehicle or of 1 ng/ml of commercially available carboxylated osteocalcin (Immunotopics) or bacterially produced uncarboxylated osteocalcin. (L) Expression of *Insulin* and *CyclinD1* in WT islets cultured in presence of 0.3 ng/ml of bacterially produced uncarboxylated osteocalcin or vehicle. In (A)–(C) and (G)–(L): \*p < 0.05 versus WT (Student's t test); in (D)–(F), °p < 0.05 versus WT and \*p ≤ 0.001 versus WT (ANOVA followed by post hoc analysis).

expressed in human osteoblasts, suggesting that they may fulfill its function (data not shown).

**Mediation of Osteoblasts' Metabolic Functions**

What are the genetic and molecular bases of osteoblasts' metabolic functions? Coculture assays using filters separating each cell type demonstrated that it is through the release of one or several hormones that these functions are achieved. Mice lacking the osteoblast-specific secreted molecule osteocalcin develop a series of phenotypic abnormalities such as decreased insulin secretion, decreased β-cell proliferation, insulin resistance, increased adiposity, and serum triglyceride levels that mirror those observed in *Esp*<sup>-/-</sup> mice. Removing one allele of *Osteocalcin* corrects *Esp*<sup>-/-</sup> mice metabolic abnormali-

ties. In cell culture osteocalcin stimulates *CyclinD1* expression in β-cells and replicates the effect of osteoblasts on *Insulin* and *Adiponectin* expression. Reintroducing purified osteocalcin in *Osteocalcin*<sup>-/-</sup> mice corrects their glucose intolerance and enhances insulin secretion. When considered collectively these observations suggest that osteocalcin is a bone-derived hormone involved in the regulation of energy metabolism. This does not exclude the possibility that osteoblasts may secrete additional hormones regulating energy metabolism. Other cell types, such as adipocytes, also secrete multiple hormones regulating energy metabolism (Spiegelman and Flier, 2001).

The evidence provided suggests that uncarboxylated osteocalcin is mediating the metabolic functions of this hormone. The mechanisms whereby OST-PTP affects

this posttranslational modification remain unknown. It should be emphasized that most circulating hormones associate with a regulatory protein and are inactive. Thus, that only 10% of osteocalcin is bioactive is in line with this general rule in endocrinology (DeGroot and Jameson, 2001). Furthermore, at least one other  $\gamma$ -carboxylated protein, prothrombin, becomes active, as thrombin, when the carboxylated residues are removed (Furie and Furie, 1988).

### Skeleton and Regulation of Energy Metabolism

Our results add further credence to the concept that bone and energy metabolisms exert reciprocal regulations. Indeed, the resistance of *Esp*<sup>-/-</sup> mice to obesity, glucose intolerance, and insulin resistance together with the osteoblast-specific expression of osteocalcin identify the skeleton as a rheostat regulating glucose metabolism. They also raise the possibility that skeleton may contribute to the development of the metabolic syndrome since *Esp*<sup>-/-</sup> mice do not develop obesity or diabetes. Clinical observations showing that serum osteocalcin levels are significantly lower in type 2 diabetic patients and become normal following improvement of glycemic control are also consistent with this idea (Rosato et al., 1998).

Lastly, our results raise teleological questions. For instance, why would a bone-specific hormone regulate energy metabolism? What is the need for a hormone favoring  $\beta$ -cell proliferation and insulin secretion? In both cases we can only speculate. For the first question, given the large surface it covered, skeleton is an excellent site of hormone synthesis. Along this line it is possible that other hormones remain to be identified in osteoblasts. Alternatively, osteocalcin and possibly other hormones may have been recruited to skeleton through tinkering during evolution. As for the second question, it is conceivable that the proliferation function of osteoblast-secreted hormones may have been required during evolution to maintain the constant size of the islets in periods of food deprivation.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

### Mice Generation

Generation of *Esp-nLacZ* and *Osteocalcin*<sup>-/-</sup> mice was previously reported (Dacquin et al., 2004; Ducy et al., 1996). To generate osteoblast-specific *Esp*-deficient (*Esp*<sub>osb-/-</sub>) mice a targeting vector harboring LoxP sites within introns 23 and 35 as well as a floxed neomycin resistance cassette were electroporated into ES cells. Targeted ES cells were injected in 129Sv/EV blastocysts to generate chimeric mice harboring the floxed allele (*Esp*<sub>lox</sub>). *Esp*<sub>lox/+</sub> mice were crossed with  $\alpha 1(I)$ collagen-Cre mice to generate *Esp*<sub>osb-/-</sub> mice, and their progeny was intercrossed to obtain *Esp*<sub>osb-/-</sub> mice. *Adiponectin*<sup>+/-</sup> mice were generated according to a previously described strategy (Maeda et al., 2002). Transgenic  $\alpha 1(I)$ -*Esp* mice were generated by pronuclei injection of a construct fusing full-length *Esp* cDNA with the osteoblast-specific fragment of the mouse *type I collagen* promoter (Dacquin et al., 2002). All procedures involving animals were approved by the IACUC and conform to the relevant regulatory standards.

### Metabolic Studies

For glucose tolerance test (GTT) glucose (2 g/kg body weight [BW]) was injected intraperitoneally (IP) after an overnight fast, and blood

glucose was monitored using blood glucose strips and the Accu-Check glucometer (Roche) at indicated times. For glucose-stimulated insulin secretion test (GSIS) glucose (3 g/kg BW) was injected IP after an overnight fast; sera were collected from tails and insulin measured as described (Mauvais-Jarvis et al., 2000). For insulin tolerance test (ITT) mice were fasted for 6 hr, injected IP with insulin (0.2 U/kg BW), and blood glucose levels were measured at indicated times as described (Mauvais-Jarvis et al., 2002). ITT data are presented as percentage of initial blood glucose concentration. Hyperinsulinemic-euglycemic clamps were performed at Penn State Mouse Metabolic Phenotyping Center. Briefly, *Esp*<sup>-/-</sup>, *Ocn*<sup>-/-</sup>, and WT littermates (n = ~4–8 for each group) were fasted overnight, and a 2 hr hyperinsulinemic (2.5 mU/kg/min)-euglycemic clamp was performed following intravenous administration of [<sup>3</sup>-<sup>3</sup>H] glucose and 2-deoxy-D-[1-<sup>14</sup>C] glucose as previously described (Kim et al., 2004). Gold thioglucose (600 mg/kg BW, USP) was injected IP, and mice were sacrificed 3 months later for analysis. High fat diet (HFD) studies were performed as described (Eleftheriou et al., 2006). Body weight was measured every 3 weeks after HFD; GTT and ITT were performed in mice fed a HFD for 6 weeks. Streptozotocin (150 mg/kg single injection) was injected IP and blood glucose measured as described above every 2 days thereafter. After 8 days pancreas was isolated to measure insulin content as previously described (Mauvais-Jarvis et al., 2000). Food intake was measured using metabolic cages as the daily change of food weight. Energy expenditure was measured using metabolic cages connected to a calorimeter. Heat values (Kcal/hr) were recorded over 2 days and reported to each mouse BW.

### Laboratory Measurements

Blood was collected by heart puncture of isoflurane-anesthetized mice in the fed and fasted states. Colorimetric assays were used to measure serum levels of free fatty acids and of triglycerides (Sigma). Serum levels of insulin and leptin (Crystal Chem Inc. kit); adiponectin, Resistin, Amylin, and PYY (Linco kit); C-peptide (Gentaur kit); and IGF-1 (DSL kit) were quantified by ELISA. Human and mouse osteocalcin levels were quantified by IRMA (Immunotopics kit).

### Mouse Islets and Primary Cells Isolation and Culture

Islets were isolated on Histopaque gradient. In brief, after clamping the common bile duct at its entrance to the duodenum, 1 mg/ml collagenaseP in M199 medium was injected into the duct. The swollen pancreas was surgically removed and incubated at 37°C for 17 min. Digested pancreata were dispersed by pipetting, rinsed twice, filtered through a Spectra-mesh (400  $\mu$ m), resuspended in Histopaque, and overlaid with M199 medium. Islets were collected following centrifugation at 1,700 g for 20 min, washed twice with cold M199 medium, resuspended in M199/1%NCS or  $\alpha$ MEM/1%FBS medium, and cultured at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>.

Primary adipocytes were isolated from epididymal fat pads by collagenase digestion. Briefly, minced adipose tissue was digested by 1 mg/ml collagenaseP in KRP Buffer (20 mM HEPES, 120 mM NaCl, 6 mM KCl, 1.2 mM MgSO<sub>4</sub>, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.6 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.4 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2.5 mM D-glucose, 2%BSA, pH 7.4) for 1 hr at 37°C. The isolated cells were washed twice with KRP Buffer before being cultured in  $\alpha$ MEM/1%FBS at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>.

Primary osteoblasts were prepared from calvaria of 5-day-old pups as previously described (Ducy et al., 2000a) and were cultured in  $\alpha$ MEM/10% FBS in the presence of 100  $\mu$ g/ml ascorbic acid and 5 mM  $\beta$ -glycerophosphate for 5 days. Skin fibroblasts were isolated by collagenase digestion (0.5 mg/ml) and were cultured in  $\alpha$ MEM/10% FBS. Twenty-four hours before addition of primary islets (or adipocytes) osteoblasts (or fibroblasts) were placed in  $\alpha$ MEM/1%FBS. For warfarin treatment primary osteoblasts were maintained in  $\alpha$ MEM/F12/10%FBS until being supplemented with 50  $\mu$ M warfarin or vehicle in  $\alpha$ MEM/F12/1%FBS for 48 hr prior to coculture with adipocytes. After 4 hr of coculture either in the presence or absence of (1  $\mu$ M)

culture inserts (Falcon) islets (or adipocytes) were collected for RNA isolation using TRIZOL.

#### Gene Expression Analyses

Real-time PCR was performed on DNaseI-treated total RNA converted to cDNA using primers were from SuperArray and the Taq SYBR Green Supermix with ROX on an MX3000 instrument;  $\beta$ -actin amplification was used as an internal reference for each sample except in Figure 7L, where *Glucagon* expression was used. X-gal staining was carried out as described (Dacquin et al., 2004).

#### Histology

Livers were cryoembedded, sectioned at 5  $\mu$ m, and stained with Oil red O. Fat and pancreatic tissues were fixed in 10% neutral formalin, embedded in paraffin, and sectioned at 5  $\mu$ m; sections were stained with hematoxylin and eosin (H&E). Immunohistochemistry was performed using rabbit anti-insulin (SantaCruz, 1:100) and mouse anti-Ki67 (Vector, 1:100) antibodies and ABC Elite kits (Vector). To evaluate cell sizes or numbers, five to ten sections (each 50  $\mu$ m apart) were analyzed using a 40 $\times$  objective on a Leica microscope outfitted with a CCD camera (SONY) and using the Osteomeasure software.  $\beta$ -cell area represents the surface positive for insulin immunostaining divided by the total pancreatic surface.  $\beta$ -cell mass was calculated as  $\beta$ -cell area multiplied by pancreatic weight. At least three mice were analyzed per condition. Tibias anterior muscles were fixed in 4% PFA/2% glutaraldehyde/0.1 M sodium cacodylate pH 7.3, postfixed in 1% osmium tetroxide, and embedded in epoxy resin (Epon). Ultrathin sections were stained in 4% aqueous Uranyl Acetate and for 2 min in Reynolds' Lead Citrate and then were examined with a JEOL 2000FX. Ten electron micrographs per mouse were digitized, and the area of each clearly distinguishable mitochondria was analyzed using ImageJ software. Fifteen to 25 individual mitochondria were measured in four mice of each genotype.

#### Osteocalcin Production and Hydroxyapatite-Binding Assay

GST-osteocalcin fusion protein was bacterially produced and purified on glutathione beads according to standard procedures. Osteocalcin was then cleaved out from the GST subunit using thrombin, and its purity was assessed by SDS-PAGE.

Sera from 1-month-old mice or supernatant from warfarin-treated osteoblast cultures was added to hydroxyapatite (HA) slurry to achieve a final concentration of 25 mg slurry/ml. After 15 min HA beads were pelleted by centrifugation, and HA-bound osteocalcin was eluted with 0.5 M sodium phosphate buffer, pH 8.0. Osteocalcin present in eluates and initial samples was measured by IRMA. Values represent percentage of HA-bound osteocalcin over initial osteocalcin content.

#### Statistics

Results are given as means  $\pm$  standard deviations except in Figures 2B and 5F, where means  $\pm$  standard errors of the mean are shown. Statistical analyses were performed using unpaired, two-tailed Student's *t* or ANOVA tests followed by post hoc tests.

#### Supplemental Data

Supplemental Data include six figures and one table and can be found with this article online at <http://www.cell.com/cgi/content/full/130/3/456/DC1/>.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We thank X. Liu, S. Houlihan, L. Malynowsky, and R. Wilson for their assistance; Drs. D. Accili, T. Kitamura, and R. Leibel for suggestions and advices; and Dr. R. Axel for critical reading of the manuscript. M.D.M. is a scholar of the Fonds de la recherche en santé du Québec. This work was supported by a fellowship of JSPS (E.H.) and grants from NIH (G.K.), the American Diabetes Association, and the Pennsylvania Department of health (J.K.).

Received: December 9, 2006

Revised: March 17, 2007

Accepted: May 21, 2007

Published: August 9, 2007

#### REFERENCES

- Berkner, K.L. (2005). The vitamin K-dependent carboxylase. *Annu. Rev. Nutr.* 25, 127–149.
- Brecher, G., Laqueur, G.L., Cronkite, E.P., Edelman, P.M., and Schwartz, I.L. (1965). The Brain Lesion of Goldthiogluucose Obesity. *J. Exp. Med.* 121, 395–401.
- Cousin, W., Courseaux, A., Ladoux, A., Dani, C., and Peraldi, P. (2004). Cloning of hOST-PTP: the only example of a protein-tyrosine-phosphatase the function of which has been lost between rodent and human. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 321, 259–265.
- Dacquin, R., Starbuck, M., Schinke, T., and Karsenty, G. (2002). Mouse alpha1(I)-collagen promoter is the best known promoter to drive efficient Cre recombinase expression in osteoblast. *Dev. Dyn.* 224, 245–251.
- Dacquin, R., Mee, P.J., Kawaguchi, J., Olmsted-Davis, E.A., Gallagher, J.A., Nichols, J., Lee, K., Karsenty, G., and Smith, A. (2004). Knock-in of nuclear localised beta-galactosidase reveals that the tyrosine phosphatase Ptpv is specifically expressed in cells of the bone collar. *Dev. Dyn.* 229, 826–834.
- DeGroot, L., and Jameson, J.L. (2001). *Endocrinology* (Philadelphia: Elsevier).
- Ducy, P., Amling, M., Takeda, S., Priemel, M., Schilling, A.F., Beil, F.T., Shen, J., Vinson, C., Rueger, J.M., and Karsenty, G. (2000a). Leptin inhibits bone formation through a hypothalamic relay: a central control of bone mass. *Cell* 100, 197–207.
- Ducy, P., Desbois, C., Boyce, B., Pinero, G., Story, B., Dunstan, C., Smith, E., Bonadio, J., Goldstein, S., Gundberg, C., et al. (1996). Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice. *Nature* 382, 448–452.
- Ducy, P., Schinke, T., and Karsenty, G. (2000b). The osteoblast: A sophisticated fibroblast under central surveillance. *Science* 289, 1501–1504.
- Eleftheriou, F., Benson, M.D., Sowa, H., Starbuck, M., Liu, X., Ron, D., Parada, L.F., and Karsenty, G. (2006). ATF4 mediation of NF1 functions in osteoblast reveals a nutritional basis for congenital skeletal dysplasias. *Cell Metab.* 4, 441–451.
- Friedman, J.M., and Halaas, J.L. (1998). Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature* 395, 763–770.
- Furie, B., and Furie, B.C. (1988). The molecular basis of blood coagulation. *Cell* 53, 505–518.
- Harada, S., and Rodan, G.A. (2003). Control of osteoblast function and regulation of bone mass. *Nature* 423, 349–355.
- Hauschka, P.V., Lian, J.B., Cole, D.E., and Gundberg, C.M. (1989). Osteocalcin and matrix Gla protein: vitamin K-dependent proteins in bone. *Physiol. Rev.* 69, 990–1047.
- Kadowaki, T., and Yamauchi, T. (2005). Adiponectin and adiponectin receptors. *Endocr. Rev.* 26, 439–451.
- Karsenty, G. (2006). Convergence between bone and energy homeostases: Leptin regulation of bone mass. *Cell Metab.* 4, 341–348.
- Kim, H.J., Higashimori, T., Park, S.Y., Choi, H., Dong, J., Kim, Y.J., Noh, H.L., Cho, Y.R., Cline, G., Kim, Y.B., and Kim, J.K. (2004). Differential effects of interleukin-6 and -10 on skeletal muscle and liver insulin action in vivo. *Diabetes* 53, 1060–1067.
- Kushner, J.A., Ciemerych, M.A., Sicinska, E., Wartschow, L.M., Teta, M., Long, S.Y., Sicinski, P., and White, M.F. (2005). Cyclins D2 and D1 are essential for postnatal pancreatic beta-cell growth. *Mol. Cell. Biol.* 25, 3752–3762.

- Le May, C., Chu, K., Hu, M., Ortega, C.S., Simpson, E.R., Korach, K.S., Tsai, M.J., and Mauvais-Jarvis, F. (2006). Estrogens protect pancreatic beta-cells from apoptosis and prevent insulin-deficient diabetes mellitus in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 9232–9237.
- Maeda, N., Shimomura, I., Kishida, K., Nishizawa, H., Matsuda, M., Nagaretani, H., Furuyama, N., Kondo, H., Takahashi, M., Arita, Y., et al. (2002). Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ACRP30. *Nat. Med.* 8, 731–737.
- Mauryama, H., Hisatomi, A., Orci, L., Grodsky, G.M., and Unger, R.H. (1984). Insulin within islets is a physiologic glucagon release inhibitor. *J. Clin. Invest.* 74, 2296–2299.
- Mauro, L.J., Olmsted, E.A., Skrobacz, B.M., Mourey, R.J., Davis, A.R., and Dixon, J.E. (1994). Identification of a hormonally regulated protein tyrosine phosphatase associated with bone and testicular differentiation. *J. Biol. Chem.* 269, 30659–30667.
- Mauvais-Jarvis, F., Virkamaki, A., Michael, M.D., Winnay, J.N., Zisman, A., Kulkarni, R.N., and Kahn, C.R. (2000). A model to explore the interaction between muscle insulin resistance and beta-cell dysfunction in the development of type 2 diabetes. *Diabetes* 49, 2126–2134.
- Mauvais-Jarvis, F., Ueki, K., Fruman, D.A., Hirshman, M.F., Sakamoto, K., Goodyear, L.J., Iannacone, M., Accili, D., Cantley, L.C., and Kahn, C.R. (2002). Reduced expression of the murine p85alpha subunit of phosphoinositide 3-kinase improves insulin signaling and ameliorates diabetes. *J. Clin. Invest.* 109, 141–149.
- Murshed, M., Schinke, T., McKee, M.D., and Karsenty, G. (2004). Extracellular matrix mineralization is regulated locally; different roles of two gla-containing proteins. *J. Cell Biol.* 165, 625–630.
- Otobe, S., Yuan, X., Fukutani, T., Wada, N., Hashinaga, T., Nakayama, H., Hirota, N., Kojima, M., and Yamada, K. (2007). Overexpression of human adiponectin in transgenic mice results in suppression of fat accumulation and prevention of premature death by high-calorie diet. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 293, E210–E218.
- Price, P.A. (1989). Gla-containing proteins of bone. *Connect. Tissue Res.* 21, 51–57.
- Raju, B., and Cryer, P.E. (2005). Loss of the decrement in intraislet insulin plausibly explains loss of the glucagon response to hypoglycemia in insulin-deficient diabetes: documentation of the intraislet insulin hypothesis in humans. *Diabetes* 54, 757–764.
- Rosato, M.T., Schneider, S.H., and Shapses, S.A. (1998). Bone turnover and insulin-like growth factor I levels increase after improved glycemic control in noninsulin-dependent diabetes mellitus. *Calcif. Tissue Int.* 63, 107–111.
- Spiegelman, B.M., and Flier, J.S. (2001). Obesity and the regulation of energy balance. *Cell* 104, 531–543.
- Steppan, C.M., Bailey, S.T., Bhat, S., Brown, E.J., Banerjee, R.R., Wright, C.M., Patel, H.R., Ahima, R.S., and Lazar, M.A. (2001). The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* 409, 307–312.
- Teitelbaum, S.L., and Ross, F.P. (2003). Genetic regulation of osteoclast development and function. *Nat. Rev. Genet.* 4, 638–649.
- Watanabe, M., Houten, S.M., Matak, C., Christoffolete, M.A., Kim, B.W., Sato, H., Messaddeq, N., Harney, J.W., Ezaki, O., Kodama, T., et al. (2006). Bile acids induce energy expenditure by promoting intracellular thyroid hormone activation. *Nature* 439, 484–489.
- Yamauchi, T., Kamon, J., Waki, H., Terauchi, Y., Kubota, N., Hara, K., Mori, Y., Ide, T., Murakami, K., Tsuboyama-Kasaoka, N., et al. (2001). The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipodystrophy and obesity. *Nat. Med.* 7, 941–946.
- Zacchigna, L., Vecchione, C., Notte, A., Cordenonsi, M., Dupont, S., Maretto, S., Cifelli, G., Ferrari, A., Maffei, A., Fabbro, C., et al. (2006). Emilin1 links TGF-beta maturation to blood pressure homeostasis. *Cell* 124, 929–942.

## V- Perspectives et évolution du modèle

### 1) La carboxylation, mode de régulation de l'ostéocalcine

Le degré de carboxylation de l'ostéocalcine pourrait participer à la régulation de son activité. La carboxylation consiste en l'ajout post-traductionnel enzymatique vitamino-K-dépendant de résidu Gla. L'ostéocalcine possède trois sites de carboxylation. Avant d'être sécrétée par l'ostéoblaste, l'ostéocalcine subit une carboxylation vitamine K dépendante de ces trois résidus Gla qui lui procure ainsi une forte affinité pour la matrice extracellulaire osseuse. Une faible partie de l'ostéocalcine reste non-carboxylée (Glu) et est sécrétée dans le sang<sup>87</sup>. D'après nos résultats, l'ostéocalcine non carboxylée est la forme active. La forme non carboxylée est la forme recombinante obtenue *in vitro*. L'ostéocalcine non carboxylée est efficace en coculture. Elle est plus élevée chez les souris *Esp<sup>-/-</sup>*. On considère actuellement qu'OST-PTP régulerait la carboxylation de l'ostéocalcine. L'inhibition de la carboxylation par un antivitamine K telle la warfarine offre un bon rationnel pour expliquer la résistance au diabète induit chez les souris traitées par warfarine<sup>88</sup>.

### 2) Singularité de l'action de l'ostéocalcine

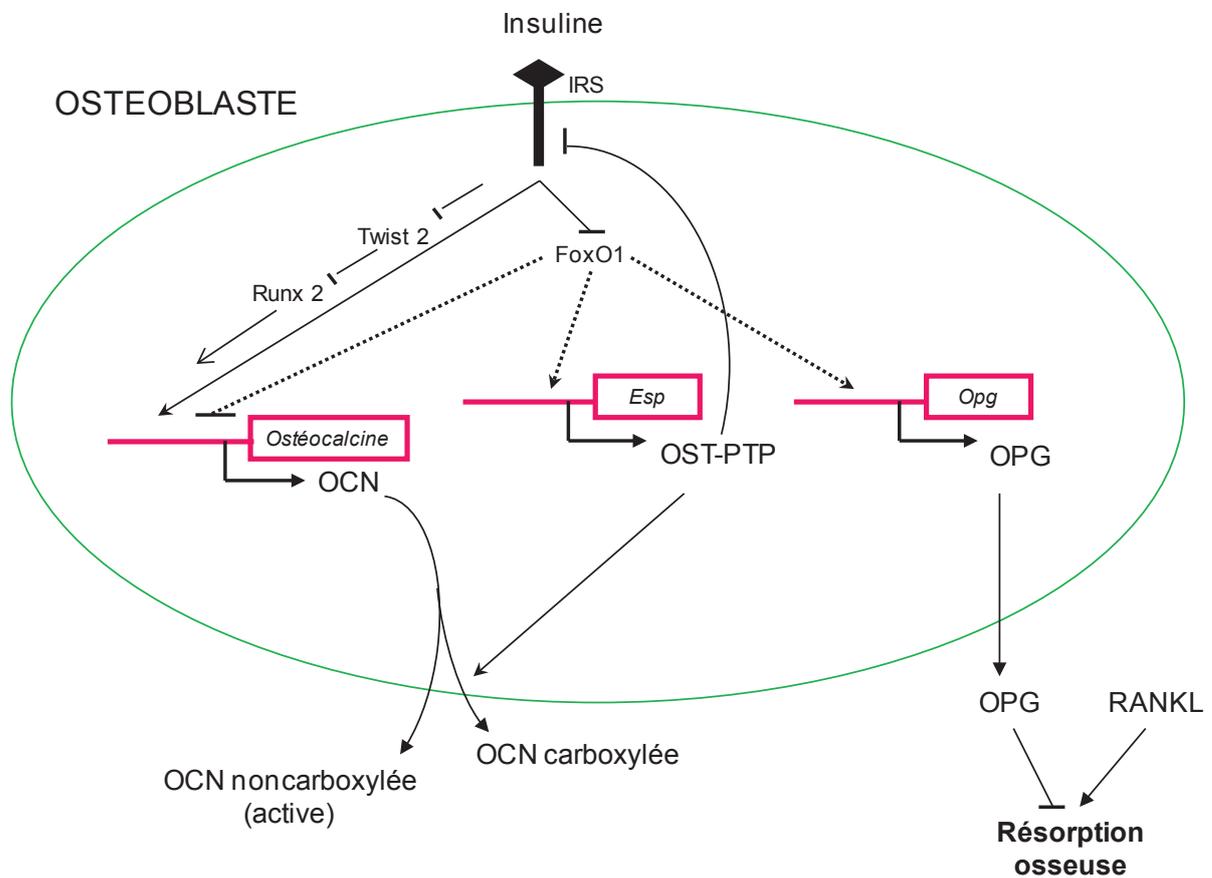
L'action de l'ostéocalcine sur l'équilibre glycémique est innovante à double titre. Il s'agit de la première démonstration d'une régulation du métabolisme énergétique par le tissu osseux. Ensuite le mécanisme d'action lui-même de l'ostéocalcine est singulier puisque cette hormone est bénéfique simultanément sur l'insulinosécrétion et l'insulinosensibilité sans prise de poids associée. Elle ouvre un nouveau champ dans la physiopathologie du métabolisme énergétique et des perspectives thérapeutiques importantes chez l'homme. Durant cette phase de transfert thérapeutique chez l'homme, l'identification du récepteur sera une étape essentielle.

### 3) Rétrocontrôle du pancréas sur l'ostéoblaste par l'insuline

Depuis ce travail initial, plusieurs nouvelles découvertes sont venues incrémenter et préciser le modèle que nous venons de présenter. Les faits majeurs sont la démonstration qu'il existe un rétrocontrôle du pancréas sur le remodelage osseux par l'intermédiaire de l'insuline et l'établissement du rôle de la résorption osseuse qui possède également une action sur le métabolisme énergétique<sup>89</sup>.

Le récepteur de l'insuline est présent à la surface des ostéoblastes. Sa délétion spécifique dans les ostéoblastes est responsable d'une intolérance au glucose indiquant que la voie de signalisation de l'insuline dans l'ostéoblaste est impliquée dans le contrôle énergétique et favorise la production d'ostéocalcine, donc l'insulinosécrétion par les cellules  $\beta$  et l'insulinosensibilité des tissus périphériques. Trois articles complémentaires ont déchiffré la voie de signalisation et les mécanismes sous des angles différents en aboutissant aux mêmes résultats.

**Figure 7** : rétrocontrôle du pancréas sur les ostéoblastes par l'intermédiaire de l'insuline. Voie de signalisation de l'insuline dans l'ostéoblaste et facteurs de transcription impliqués. Adapté de <sup>89-92</sup>.



Tout d'abord un mécanisme direct avec la délétion spécifique du récepteur de l'insuline dans l'ostéoblaste (*InsR<sup>ob-/-</sup>*) qui est responsable d'une diminution de la formation osseuse et de la production d'ostéocalcine. Dans cet article, le travail sur la voie de signalisation de l'insuline dans l'ostéoblaste montre que l'insuline inhibe Twist2 qui est un inhibiteur du facteur de transcription Runx2. Ainsi la délétion du récepteur de l'insuline dans l'ostéoblaste libère Twist2 qui inhibe la production d'ostéocalcine<sup>91</sup>.

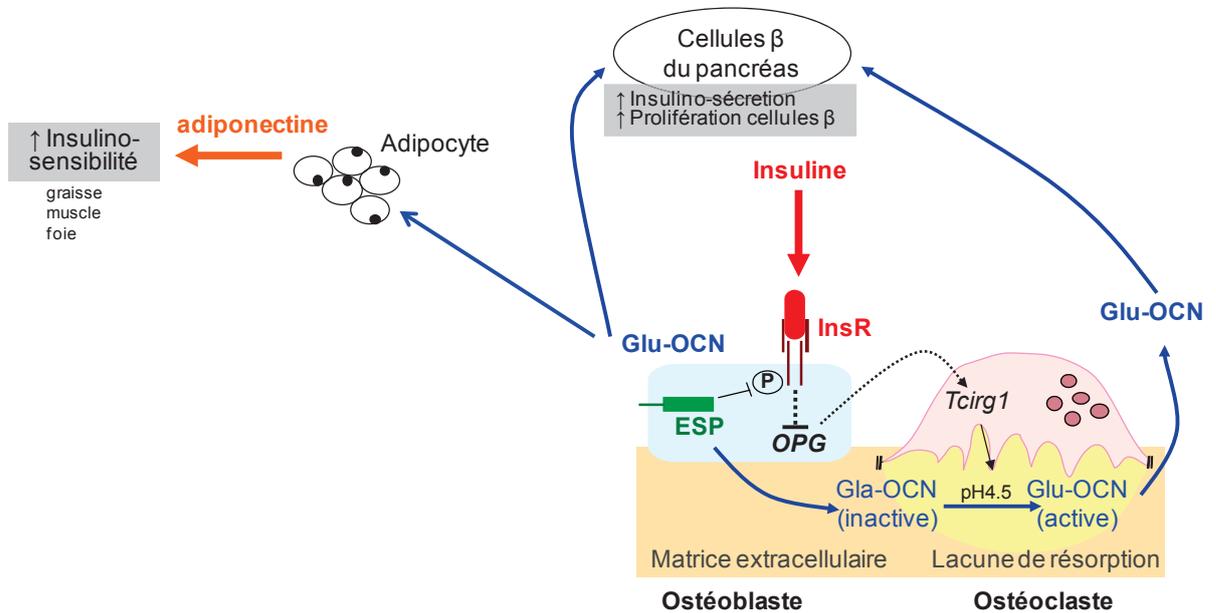
Ensuite, dans un autre article il a été démontré que le récepteur de l'insuline était un substrat de OST-PTP<sup>89</sup>. La voie de signalisation de l'insuline dans l'ostéoblaste fonctionne de façon classique comme dans de nombreux tissus en inhibant FoxO1. Dans l'ostéoblaste, Foxo1 est un facteur de transcription qui inhibe quantitativement la production d'ostéocalcine et qualitativement en stimulant la carboxylation par l'induction de *Esp*<sup>89, 92</sup>. Cette compréhension des mécanismes intracellulaires explique en fait le phénotype des souris *Esp<sup>-/-</sup>* qui s'apparentent à une augmentation d'activité de la voie de signalisation intraostéoblastique de l'insuline ce qui produit in fine plus d'ostéocalcine active (non carboxylée). Figure 7.

#### 4) Lien entre la résorption osseuse et le métabolisme énergétique

Il a également été déchiffré un mécanisme d'action indirecte de l'insuline sur le métabolisme énergétique par l'intermédiaire de la résorption osseuse. Le point de départ fut la constatation d'une nette diminution de résorption chez les souris déficiente en récepteur de l'insuline dans les ostéoblastes (*InsR<sup>ob-/-</sup>*) qui ont un phénotype diabétique par opposition à l'augmentation de résorption observée chez les souris *Esp<sup>-/-</sup>*. L'explication est en fait commune puisque l'insuline via Foxo1 dans l'ostéoblaste diminue l'expression de l'*ostéoprotégérine* (*Opg*) et donc stimule l'activité de résorption osseuse par les ostéoclastes en modifiant le ratio RankL/ostéoprotégérine<sup>89</sup>. La démonstration du lien entre la résorption osseuse et le métabolisme énergétique a ensuite été apportée par la génération de souris déficientes en pompe à proton dans les ostéoclastes (*Tcirg1<sup>-/-</sup>*). Ces souris n'ont plus de résorption osseuse car elles sont incapables d'acidifier la chambre extracellulaire et donc de dissoudre la phase minérale de la matrice extracellulaire. Il est apparu que la phase d'acidification (PH 4.5) durant la résorption osseuse permettait une décarboxylation de l'ostéocalcine piégée dans la matrice extracellulaire et le relargage dans la circulation d'ostéocalcine non carboxylée active sur le métabolisme énergétique. Figure 8.

De façon intéressante, en clinique humaine, les patients présentant une ostéopétrose ont une ostéocalcine non carboxylée circulante basse et une insuline basse<sup>89</sup>. Pour l'instant il n'y a pas de donnée publiée disponible sur le lien entre bisphosphonate au long cours et apparition d'un diabète.

**Figure 8 :** boucle de rétrocontrôle du pancréas sur les ostéoblastes par l'intermédiaire de l'insuline et mécanismes impliquant la résorption osseuse. Adapté de <sup>84, 89, 91</sup>.



## 5) Potentiel thérapeutique de l'ostéocalcine chez la souris

Afin de tester le potentiel thérapeutique de l'ostéocalcine non carboxylée, des souris sauvages adultes ont été traitées avec différentes doses d'ostéocalcine recombinante (donc non carboxylée) pendant quatre semaines en continu à l'aide de pompes implantables. À la fin du traitement, lors d'hyperglycémies provoquées, les souris traitées présentaient une meilleure tolérance au glucose avec un pic glycémique moins élevé et un retour plus rapide au niveau initial. Les souris traitées avaient également une insulïnémie augmentée de façon dose dépendante, ainsi qu'une meilleure insulinosensibilité périphérique associée à une réduction de leur graisse viscérale. Enfin, lors d'épreuves de régime hypercalorique riche en graisses, l'ostéocalcine non carboxylée ralentissait l'apparition de l'obésité et du diabète <sup>93</sup>.

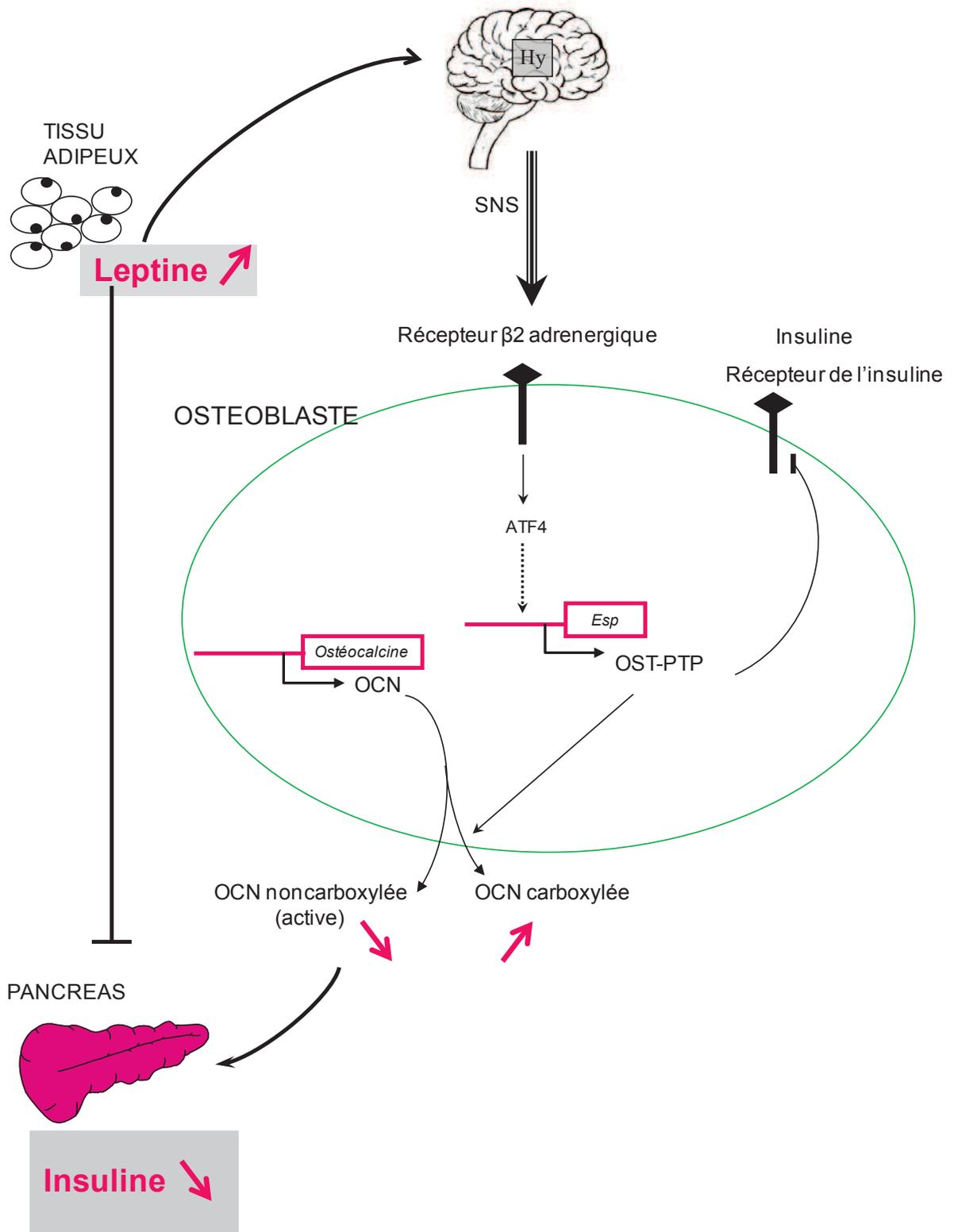
Plus récemment, une expérience similaire de traitement avec l'ostéocalcine non carboxylée recombinante vient d'être publiée en utilisant un protocole de traitement séquentiel intrapéritonéal. Les souris traitées avaient une augmentation de leurs dépenses énergétiques de base. Dans l'expérience utilisant un régime riche en graisses, l'ostéocalcine permettait une régression de la stéatose hépatique <sup>94</sup>. Le résultat est concordant avec l'expérience de l'ostéocalcine administrée en continu. Un tel résultat est très encourageant en vue du transfert thérapeutique futur chez l'homme.

## 6) Contrôle central de l'ostéoblaste et du métabolisme énergétique

Il était déjà connu depuis quelques années que la leptine avait une action directe inhibitrice de la sécrétion d'insuline sur le pancréas <sup>95, 96</sup>. La démonstration de l'effet de la leptine sur l'activité de l'ostéocalcine et donc la production d'insuline par le pancréas est arrivée secondairement. Hinoi *et al.* ont montré que la leptine régula la sécrétion d'insuline de façon indirecte par l'intermédiaire du système nerveux sympathique et de l'ostéoblaste <sup>27</sup>. Dans ces expériences, on observe que la leptine stimule le tonus sympathique qui est transmis dans l'ostéoblaste par l'intermédiaire de la voie de signalisation des récepteurs bêta 2 adrénergiques. La voie de signalisation bêta 2 adrénergique dans l'ostéoblaste stimule le facteur de transcription ATF4 qui stimule l'expression du gène *Esp*.

ATF4 est un facteur de transcription fortement spécifique des ostéoblastes avec Runx2 et Osterix <sup>97-100</sup>. Runx2 et Osterix sont surtout impliqués dans la différenciation ostéoblastique à partir des cellules souches mésenchymateuses. ATF4 est lui impliqué dans le contrôle des activités spécifiques des ostéoblastes : la formation de la masse osseuse et le contrôle du métabolisme énergétique par l'ostéoblaste en régulant *Esp* et donc l'activité de l'ostéocalcine. En effet lorsque le produit de *Esp*, OST-PTP, est augmenté il favorise d'une part la production d'ostéocalcine carboxylée inactive (Gla) et d'autre part freine la voie de signalisation intra-ostéoblastique du récepteur de l'insuline donc de la production d'ostéocalcine

**Figure 9** : la leptine freine la production d'insuline par une action directe sur le pancréas et indirecte par l'intermédiaire de l'ostéocalcine via l'action du système nerveux sympathique sur l'ostéoblaste. Adapté de <sup>27, 75, 95, 96</sup>.



## 7) Ostéocalcine médiateur clé mais pas unique dans la régulation du métabolisme énergétique par l'ostéoblaste

Récemment, une autre approche complémentaire pour mettre en évidence l'implication de l'ostéoblaste dans le métabolisme énergétique a été publiée et est basée sur la réalisation d'une délétion cellulaire globale des ostéoblastes<sup>101</sup>. Cette technique s'est déjà révélée un outil efficace pour délimiter la fonction d'un type cellulaire dans différents organes comme le cœur<sup>102</sup>, le tissu adipeux<sup>103</sup> ou les cellules dendritiques de la peau<sup>104</sup>. Les auteurs ont donc généré tout d'abord une lignée de souris transgéniques appelée *DTA<sup>fl/fl</sup>* capable d'exprimer la toxine diphtérique A (DTA) sous l'action de la *Cre recombinase*. Lorsque le type cellulaire exprime la toxine diphtérique, celle-ci est toxique pour la cellule et la détruit. Ils ont ensuite croisé ces souris avec une lignée de souris transgéniques (*Oc-CreER<sup>T2</sup>*) exprimant, en présence de tamoxifène, la *Cre recombinase* uniquement dans les cellules exprimant l'ostéocalcine (*Cre* associée au promoteur de l'ostéocalcine). Ce modèle génétique permet donc l'expression de la *Cre recombinase* uniquement dans les cellules produisant de l'ostéocalcine (ostéoblastes matures) lorsque les souris sont traitées avec du tamoxifène dans l'eau de boisson.

L'expérience a permis de détruire près de 50 % des ostéoblastes. Au plan osseux il existe une diminution de la masse osseuse et de la formation osseuse associée à une augmentation de la résorption osseuse. L'importance de l'ostéoblaste dans le contrôle du métabolisme énergétique a été clairement observée avec l'apparition d'une hyperglycémie, d'une intolérance au glucose, d'une diminution de la sensibilité à l'insuline et d'une diminution de la masse maigre. Ce phénotype est très proche de celui observé chez les souris déficientes en *ostéocalcine* et souligne le rôle de l'ostéoblaste dans le contrôle du métabolisme énergétique. Par la suite le traitement avec de l'ostéocalcine recombinante administré à des souris dont les ostéoblastes sont détruits, a montré une normalisation de leur glycémie à jeun, une correction de l'insulinémie et du nombre de cellule  $\beta$  du pancréas. En revanche l'insulinosensibilité périphérique ne fut que partiellement corrigée et la dépense énergétique de base ne fut pas modifiée. L'analyse de l'expression génique du tissu adipeux a montré en particulier qu'en cas de destruction des ostéoblastes, il y avait augmentation d'une adipokine appelée la résistine.

Cette expérience indique que l'ostéocalcine n'est sans doute pas la seule hormone sécrétée par les ostéoblastes à être active sur le métabolisme énergétique. Les travaux sont en cours pour déterminer quelles sont les autres hormones d'origine ostéoblastique active sur le métabolisme énergétique, les tissus cibles de l'insuline et la dépense énergétique de base.

## **B/ Action directe de l'ostéocalcine chez l'homme : étude « OSMID »**

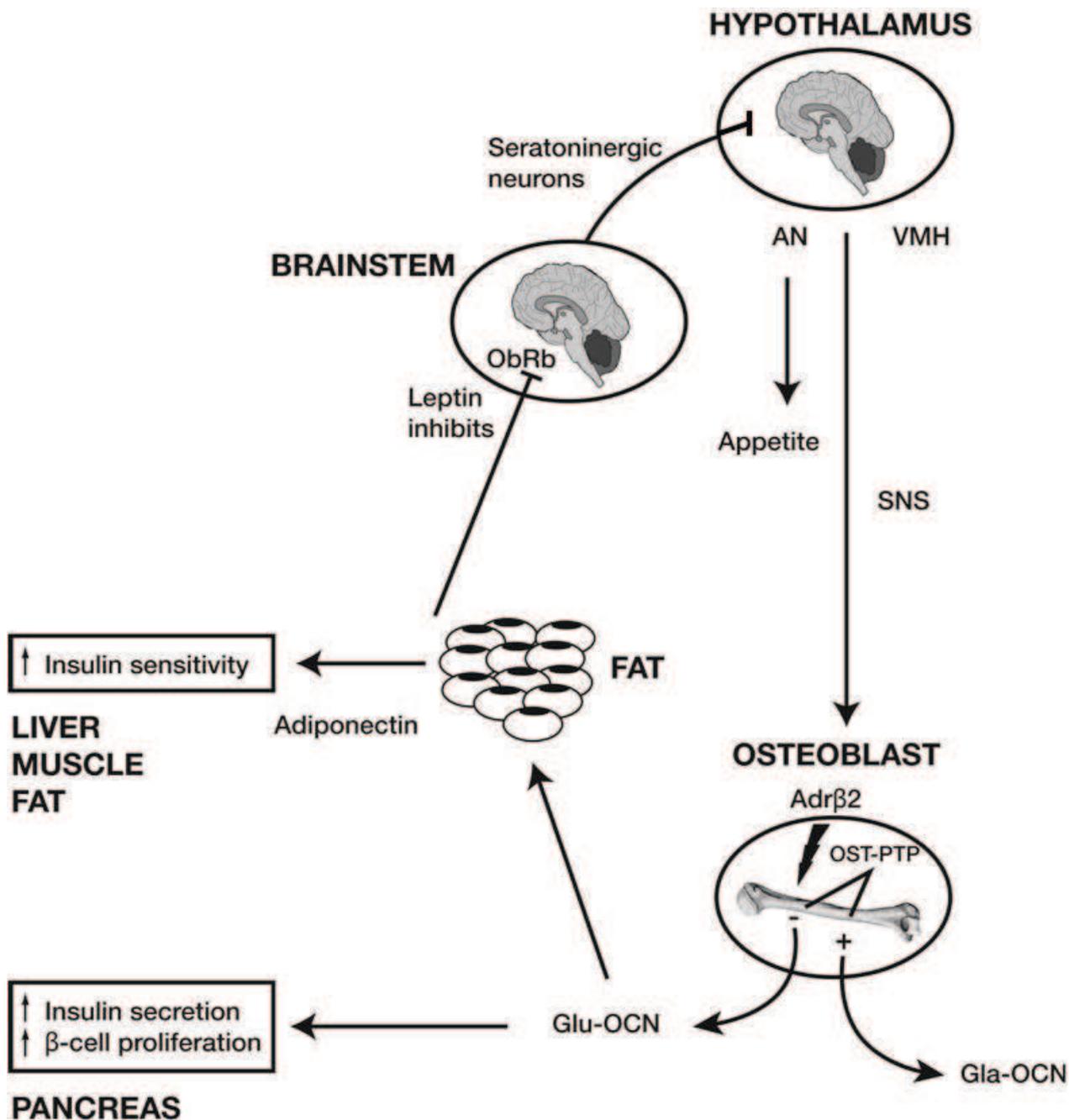
### **I- Introduction et hypothèse de travail**

La compréhension des interactions entre l'os et le métabolisme énergétique constitue un paradigme de la physiologie intégrative. Le déchiffrement de ces relations a été permis par les progrès récents de la génétique et des techniques de souris transgéniques. L'obtention de souris dites *knock-out*, c'est-à-dire globalement déficientes pour un gène, par Mario Capecchi et Oliver Smithies fut déjà une étape historique récompensée en 2007 par le Prix Nobel de Physiologie et de Médecine. Par la suite, l'arrivée des systèmes *Cre/lox* a permis de réaliser des délétions géniques conditionnelles spécifiquement dans un tissu donné, là où est exprimée la *Cre recombinase*. Cette méthode permet d'observer les modifications induites à distance dans les autres tissus. Ceci implique une bonne caractérisation du profil d'expression de la *Cre recombinase* au préalable. Le profil d'expression dépendra du promoteur utilisé et variera non seulement dans les différents tissus, les étapes de différenciation cellulaire mais également en fonction des stades de développement de l'organisme (stades embryonnaires, adulte etc...). Le choix du modèle *Cre recombinase* utilisé est donc essentiel. La tendance actuelle pousserait à utiliser différentes *Cre recombinase* pour confirmer l'effet observé. Cependant ceci se heurte à des problématiques financières et techniques car les modèles *Cre/lox* demandent la réalisation de nombreux croisements et la génération d'un très grand nombre de souris <sup>2</sup>.

Le modèle d'interactions entre l'os et le métabolisme énergétique présenté ici a été établi de façon formelle par les expériences *in vivo* utilisant de nombreux modèles de souris transgéniques. Figure 10. La force de ces expériences est de pouvoir isoler l'action d'un gène et de l'étudier dans l'ensemble de l'organisme vivant au sein de l'environnement contrôlé de l'animalerie. Une fois le modèle établi, deux questions se posent. Le système identifié est-il fonctionnel chez l'homme étant donné le changement d'espèce ? Quelle est la pertinence du système identifié pour la pathologie humaine dans le contexte de redondance des mécanismes de l'organisme et des multiples facteurs environnementaux auxquels est soumis l'individu sachant qu'un modèle KO a généralement un effet « loupe » pour l'étude de la fonction du gène.

Jusqu'alors, aucune preuve de l'action directe de l'ostéocalcine chez l'homme n'était disponible. L'observation de taux sériques d'ostéocalcine bas chez les diabétiques de type II s'améliorant avec le contrôle de la glycémie semblait confirmer les observations chez l'animal <sup>105</sup>. Il est donc apparu nécessaire d'apporter des preuves de concept du rôle de l'ostéocalcine sur la régulation du glucose chez l'homme.

**Figure 10 :** le métabolisme énergétique régule la masse osseuse par l'intermédiaire d'un contrôle central de la masse osseuse. L'os régule le métabolisme énergétique en sécrétant une hormone : l'ostéocalcine active sur le pancréas (stimulation de la sécrétion d'insuline, de la prolifération des cellules  $\beta$ ) et le tissu adipeux (augmente l'insulinosensibilité périphérique via la production d'adiponectine par les adipocytes) <sup>106</sup>.



## II- Résumé de l'étude <sup>107</sup>

En pathologie humaine, pour toute hormone, il existe une tumeur bénigne sécrétante. Nous avons donc émis l'hypothèse qu'il devait exister des tumeurs bénignes ostéoblastiques de l'adulte jeune qui pourraient sécréter de l'ostéocalcine. La tumeur ostéoblastique bénigne la plus fréquente est l'ostéome ostéoïde qui survient le plus souvent chez l'adulte jeune. Son équivalent chez l'enfant est l'ostéoblastome.

Nous avons donc mis en place un partenariat entre les services d'orthopédie du New York Presbyterian Hospital, New York - NY, USA (Dr Francis Lee) et des Hospices Civils de Lyon, Lyon - France (Pr Jacques Béjui-Hugues, Pr Jean-Paul Carret, Pr Guillaume Herzberg, Pr Rémi Kohler) pour évaluer l'effet de la résection chirurgicale des ostéomes ostéoïdes sur les taux sériques d'ostéocalcine et de la glycémie. Nous avons pris comme témoins des patients jeunes sans antécédent subissant une intervention bénigne du genou et des volontaires sains non opérés. La justification des contrôles était d'éliminer un effet lié à la procédure chirurgicale et à l'anesthésie elle-même.

Nous avons obtenu auprès des comités d'éthique de chaque hôpital les autorisations nécessaires pour réaliser cette étude non interventionnelle. Les prises de sang ont été réalisées le jour et le lendemain de l'intervention dans les mêmes conditions à savoir une prise de sang le matin avant 8 heures chez un patient à jeun depuis minuit. Durant toute l'hospitalisation, les patients ne devaient pas recevoir de perfusion contenant du glucose. L'évaluation portait sur les éléments suivants : dosage des marqueurs sériques osseux, (CTX, PAL osseuses), de la glycémie, de l'insuline, de l'ostéocalcine à T0 et T1. Les techniques de radiologie interventionnelle et de forage biopsique sous scanner (FROP) n'ont pas été retenues compte tenu de l'impossibilité de réaliser un contrôle histologique <sup>108</sup>.

Sept jeunes hommes âgés entre 22 et 38 ans ont pu être inclus dans l'étude. Leur index de masse corporelle moyen était de 23 et tous avaient une hémoglobine glycosylée normale. Parmi ces patients, deux avaient un ostéome ostéoïde, deux une chirurgie du genou bénigne et trois étaient des volontaires sains. À l'issue de la chirurgie, les ostéomes ostéoïdes avaient une disparition complète de leur douleur comme attendu. La résection chirurgicale de la tumeur s'est accompagnée d'une chute brutale du taux sérique d'ostéocalcine de 62 % et 30 % par rapport au taux initial. Dans le même temps ces patients connaissaient une hausse de leur glycémie de respectivement 32 % et 15 %. En comparaison les témoins sains et les patients contrôles présentaient un taux sérique d'ostéocalcine stable. Le dosage de l'ostéocalcine non carboxylée chez ces deux patients a montré également une baisse après l'intervention. Les variations de l'ostéocalcine sont spécifiques par rapport aux autres marqueurs osseux puisque chez tous les patients les phosphatases alcalines osseuses et les CTX étaient stables. On observait également, en réponse à cette chute d'ostéocalcine, une diminution à 24h de l'activité des cellules  $\beta$  comme l'atteste la mesure du HOMA- $\beta$  (HOMEostatic Model Assessment) et une augmentation de l'insulinorésistance mesurée par HOMA-R.

En conclusion, cette étude pilote réalisée chez l'homme est cohérente avec les résultats observés chez l'animal et peut être considérée comme une preuve de concept. Elle suggère que l'ostéome ostéoïde serait une tumeur bénigne sécrétante de l'ostéocalcine, une sorte d' « ostéocalcinome ». Cette étude constitue la première démonstration de l'action directe de l'ostéocalcine sur le métabolisme glucidique chez l'homme.

### III- Focus sur l'ostéocalcine humaine et son dosage <sup>109</sup>

L'ostéocalcine est une petite hormone protéique de 49 acides aminés et 110 kDa synthétisée par les ostéoblastes matures, l'odontoblaste et les chondrocytes hypertrophiques. Elle fait partie du groupe des protéines non collagéniques de la matrice osseuse.

Le gène de l'ostéocalcine humaine (*BGLAP-001*) est situé sur le chromosome 1q25-q31 mesure 732 pb et comprend 4 exons. Un deuxième gène adjacent *BGLAP-002* est un pseudo gène non codant. Le gène de l'ostéocalcine n'est pas exprimé par les cellules non osseuses. Il n'est pas non plus exprimé dans les stades précoces prolifératifs de l'ostéoblaste. L'ostéocalcine constitue donc un marqueur de différenciation des ostéoblastes matures.

La transcription du gène de l'ostéocalcine est sous la dépendance du facteur de transcription Runx2/Cbfa1 <sup>97, 110-114</sup>. Le promoteur du gène de l'ostéocalcine comprend dans l'ordre du plus loin au plus près de la TATA box : 1 site Runx2 (-600pb), 1 site de réponse à la vitamine D (VDRE – Vitamin D Response Element), 1 site Runx2 et un 1 site C/EBP (-70 pb). Il existe également des sites AP-1. Le site VDRE fonctionne comme un potentialisateur de l'expression de l'ostéocalcine <sup>115, 116</sup>.

L'ostéocalcine est produite sous forme de pro-peptide de 100 acides aminés qui est clivé durant la maturation dans le reticulum endoplasmique. Elle comprend un pont disulfure entre C23 et C29 et trois résidus acides  $\gamma$ -carboxyglutamique (Gla) (E17, E21 et E24) qui lient fortement le calcium. La  $\gamma$ -carboxylation est une modification post-traductionnelle vitamine K dépendante réalisée par l'enzyme VKORC dans le réticulum endoplasmique. Plus de 95% de l'ostéocalcine produite par l'ostéoblaste dans les conditions normales est carboxylée. La forme carboxylée a une forte affinité pour l'hydroxyapatite et reste donc dans la matrice osseuse. Seule une faible quantité passe dans le sang rejoignant la forme non carboxylée directement sécrétée par les ostéoblastes <sup>117, 118</sup>. Le pool sanguin comprend également de l'ostéocalcine issue de la résorption par les ostéoclastes et relarguée dans la circulation. L'ostéocalcine circulante est filtrée par le glomérulaire rénal et éliminée. La demi-vie plasmatique de l'ostéocalcine chez l'homme est estimée à 20 minutes. Les concentrations sériques d'ostéocalcine sont inversement corrélées avec la clairance de la créatinine <sup>119</sup>.

L'ostéocalcine sérique suit un rythme circadien caractérisé par une diminution progressive au cours de la matinée pour atteindre un minimum à midi. Ensuite, on note une augmentation progressive jusqu'à atteindre un pic après minuit. La différence entre le pic et le nadir sur une durée de 24 heures peut aller de 10 à 20 %

suivant les dosages <sup>120</sup>. Des variations saisonnières ont également été rapportées avec un niveau d'ostéocalcine plus élevé en hiver et au printemps <sup>121-123</sup>. Il est également noté une augmentation significative de l'ostéocalcine durant la phase lutéale du cycle menstruel <sup>124</sup>.

Les taux sériques sont plus élevés chez l'enfant que chez l'adulte et sont bien corrélés avec la vitesse de croissance. Le taux maximal d'ostéocalcine sérique est atteint à la puberté. Chez l'adulte, les taux circulants d'ostéocalcine sont plus élevés chez l'homme que chez la femme. Par la suite, il existe une diminution progressive des taux d'ostéocalcine avec l'âge en dehors d'une ascension transitoire après la ménopause chez la femme <sup>125</sup>. Bien que la formation osseuse soit normalement augmentée au troisième trimestre de la grossesse, les taux d'ostéocalcine n'augmentent pas <sup>126</sup>. En cas de fracture, l'ostéocalcine est augmentée et persiste élevée pendant au moins trois mois <sup>127</sup>. Certaines situations cliniques comme l'hyperthyroïdie s'accompagnent d'une augmentation de l'ostéocalcine. La démonstration de l'action de la T3 a été apportée in vitro avec des cellules ROS17/2.8 <sup>128-131</sup>.

Dans notre étude, le dosage de l'ostéocalcine non carboxylée est réalisé de la façon suivante selon la méthode d'hydroxy-apatite (HAP). Dans nos mains, le kit Takara® donne des résultats médiocres avec beaucoup de variations.

1. Peser 7.5 mg d'HAP sur une balance de haute précision dans un tube Eppendorf
2. Ajouter 250 µl de serum à doser.
3. Agiter les échantillons (Vortex).
4. Incuber pendant 1 heure à température ambiante sur un agitateur lent (end over end).
5. Centrifuger les échantillons à 2500 rpm pendant 15 min.
6. Puis doser simultanément sur l'automate Elecsys® 2010 (Roche Diagnostics, Mannheim, Allemagne) l'ostéocalcine dans le sérum natif et après passage sur la colonne d'HAP. On obtient une valeur d'ostéocalcine totale et une valeur d'ostéocalcine non carboxylée que l'on peut exprimer soit en valeur brute (ng/mL) soit en pourcentage du total.

NB : Le pourcentage d'ostéocalcine carboxylée est obtenu par soustraction de la valeur non carboxylée à celle du dosage d'ostéocalcine totale divisé par la totale.

NB2 : Ce dosage ne permet pas de différencier les formes partiellement carboxylées.

Référence HAP : poudre de calcium phosphate tribasique C5262 Sigma-Aldrich St Louis, Missouri USA.

**IV- Article** <sup>107</sup>

**Osteoid osteoma is an osteocalcinoma  
affecting glucose metabolism.**

**Confavreux CB**, Borel O, Lee F, Vaz G, Guyard M, Fadat C, Carlier MC, Chapurlat R, Karsenty G.

*Osteoporosis Int* 2011 (e-pub June 2011)

## CASE REPORT

## Osteoid osteoma is an osteocalcinoma affecting glucose metabolism

C. B. Confavreux · O. Borel · F. Lee · G. Vaz ·  
M. Guyard · C. Fadat · M.-C. Carlier · R. Chapurlat ·  
G. Karsenty

Received: 29 March 2011 / Accepted: 24 May 2011

© International Osteoporosis Foundation and National Osteoporosis Foundation 2011

**Abstract** Osteocalcin is a hormone secreted by osteoblasts, which regulates energy metabolism by increasing  $\beta$ -cell proliferation, insulin secretion, insulin sensitivity, and energy expenditure. This has been demonstrated in mice, but to date, the evidence implicating osteocalcin in the regulation of energy metabolism in humans are indirect. To address this question more directly, we asked whether a benign osteoblastic tumor, such as osteoma osteoid in

young adults, may secrete osteocalcin. The study was designed to assess the effect of surgical resection of osteoid osteoma on osteocalcin and blood glucose levels in comparison with patients undergoing knee surgery and healthy volunteers. Blood collections were performed the day of surgery and the following morning after overnight fasting. Patients and controls were recruited in the orthopedic surgery department of New York Presbyterian Hospital, NY-USA and Hospices Civils de Lyon, France. Seven young males were included in the study: two had osteoid osteoma, two underwent knee surgery, and three were healthy volunteers. After resection of the osteoid osteomas, we observed a decrease of osteocalcin by 62% and 30% from the initial levels. Simultaneously, blood glucose increased respectively by 32% and 15%. Bone turnover markers were not affected. This case study shows for the first time that osteocalcin in humans affects blood glucose level. This study also suggests that osteoid osteoma may be considered, at least in part, as an osteocalcinoma.

**Funding sources** This work was supported by grants from Philippe Foundation Inc, Société Française de Rhumatologie (SFR), and Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC) to C.B. Confavreux.

C. B. Confavreux · G. Karsenty  
Department of Genetics and Development,  
College of Physicians and Surgeons, Columbia University,  
New York, NY 10032, USA

C. B. Confavreux (✉) · O. Borel · C. Fadat · R. Chapurlat  
Department of Rheumatology, Hospices Civils de Lyon,  
INSERM UMR 1033, Université de Lyon,  
Pavillon F, 5 place d'Arsonval,  
69003 Lyon, France  
e-mail: cyril.confavreux@inserm.fr

F. Lee  
Department of Orthopedic Surgery,  
College of Physicians and Surgeons, Columbia University,  
New York, NY 10032, USA

G. Vaz · M. Guyard  
Department of Orthopedic Surgery, Hospices Civils de Lyon,  
Université de Lyon,  
69003 Lyon, France

M.-C. Carlier  
Hospices Civils de Lyon, Fédération de Biochimie, Groupement  
Hospitalier Sud,  
69495 Pierre Bénite, France

**Keywords** Adenoma · Blood glucose · Endocrine tumor ·  
Osteocalcin · Osteoid osteoma

### Introduction

The understanding of the crosstalk between bone and whole-body physiology relied on several clinical facts. Among them, one can cite that osteoporosis invariably follows gonadal deficiency, a second one that obesity reduces fracture risk and the third that reflex sympathetic dystrophy shows a local demineralisation. Taken together, these observations led to the hypothesis that the regulation of bone mass accrual, energy metabolism, and reproduction

may be coordinated [1, 2]. One of the hormone involved in this regulation is the uncarboxylated form of osteocalcin an osteoblast-specific secreted molecule [3]. In mice, osteocalcin regulates energy metabolism through several means. First, it increases  $\beta$ -cell proliferation and insulin secretion, second, it enhances insulin sensitivity in target tissues (liver, muscle, fat), and third, it increases energy expenditure [4, 5]. A consequence of all these beneficial actions is that wild-type mice treated with uncarboxylated osteocalcin for 1 month had improved glucose tolerance, increased serum insulin level, and reduced fat mass in comparison to placebo-treated mice [6]. Although osteocalcin is increasingly viewed as a reliable marker of the state of glucose tolerance in humans, there is a need to provide direct evidence that it is indeed the case that it plays a role in glucose homeostasis.

To address this question, we asked whether benign osteoblastic tumor may secrete osteocalcin. We focused on osteoid osteoma which is the most frequent benign osteoblast tumor in young adults.

## Materials and methods

### Study population

The study was designed to assess the effect of the surgical resection of osteoid osteoma on osteocalcin and blood glucose in comparison with patients undergoing knee surgery and healthy volunteers. The protocol did not affect the standard care for surgical treatment of osteoma osteoid. Patients, controls, and healthy volunteers were recruited in the Orthopedic Surgery Department of the New York Presbyterian Hospital, NY- USA and of the Hospices Civils de Lyon, France. The study was approved by the local ethic committee of each hospital, and each participant gave a written informed consent. We recruited young males operated for osteoid osteoma and benign knee surgery as controls. Patients and controls underwent surgery with general anaesthesia. Infusions containing glucose were not allowed during anaesthesia and the stay in clinic. Technically, osteoid osteoma was removed using a curette to permit a complete resection of the tumor and the adjacent tissue and to avoid local destruction of the osteoma. Normal male subjects who were not operated were also recruited as healthy volunteers.

### Sample collection

The first blood collection occurred the day of surgery (day 0) before 8 am and after overnight fasting. The second blood collection occurred the following morning (day 1) in the same conditions.

### Biochemistry

Bone remodelling and glucose metabolism were assessed using local routine procedures. Alkaline phosphatase (AP) [95% IC normal range; 30–130 UI/L] was measured by IFCC with AMP assay (AU2700<sup>®</sup>; Beckman Coulter). Serum assessment of bone-specific alkaline phosphatase (BSAP) [3.0–15.0  $\mu$ g/L] was performed using an immunochemiluminometric assay (Access II<sup>®</sup>; Beckman Coulter). Serum type I collagen breakdown products (CTX) [134–946 pg/mL between 18 and 29 years and 16–584 pg/mL between 30 and 50 years] and serum osteocalcin (OCN) [24–70 ng/mL between 18 and 29 years and 14–42 ng/mL between 30 and 50 years] were assessed by electrochemiluminescent assay using an automatic analyzer (Elecsis<sup>®</sup>; Roche Diagnostic). Serum blood glucose was measured by hexokinase assay (Dimension Vista<sup>®</sup>; Siemens) and serum insulin by radioimmunometric assay (Insulin IRMA kit1251<sup>®</sup> DIA-source Immuno Assays S.A). Glycohemoglobin A1c was assessed by HPLC-kit NU (VarianII<sup>®</sup>; BioRad).

For uncarboxylated osteocalcin (unOCN) measurement, frozen serums were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  to assess simultaneously uncarboxylated osteocalcin. Briefly, 7.5 mg of hydroxyapatite (HA) were weighed on a precision balance and placed in an Eppendorf<sup>®</sup> tube. Serum sample (250  $\mu$ L) was added and vortexed. Then, the sample was incubated for 1 h at room temperature on an end-over-end mixer. Finally, it was centrifuged at 2,500 rpm for 15 min at  $4^{\circ}\text{C}$ . Measurement of osteocalcin was performed on supernatant and total serum. Results were expressed in nanograms per millilitre and as percentage of total osteocalcin. The detection limit of osteocalcin was 0.5 ng/mL. The interassay coefficient of variation (CV) was 11.1% for 21.4 ng/mL, 11.9% for 27.1 ng/mL, and 12.6% for 109.1 ng/mL. The intraassay CV for total osteocalcin was 1.4% and 4.1% for uncarboxylated osteocalcin after hydroxyapatite method.

### Immunohistochemistry

Anatomopathology was performed according the routine process and analysed in light microscopy after HE staining. Immunohistochemistry used osteocalcin antibody 1:20 from Biogenex #AM386-5M<sup>®</sup>.

## Results

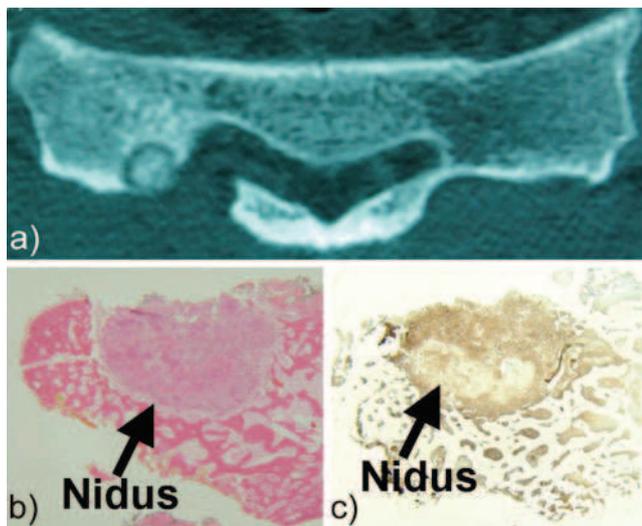
Seven males patients aged between 22 and 38 years were included in the study. Their body mass index (BMI) was normal  $23.3 \pm 1.2 \text{ kg/m}^2$  (mean  $\pm$  SD). Cases and controls were not diabetic with normal glycohemoglobin A1c. Two

patients presented an osteoid osteoma, two underwent knee surgery, and three were healthy volunteers.

The first case occurred in a 24-year-old man who had been suffering for 3 years from a right sacral pain. Pain peaked at night and was relieved by high dose non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID) (400 mg of nimesulide). He had no medical history. CT scan showed a nidus located in the third right sacral hole (Fig. 1a). The day after resection, the pain had disappeared and analgesics were stopped. Histology analysis confirmed the osteoid osteoma diagnosis. In addition to regular HE staining, immunochimistry staining with osteocalcin antibody showed a high level of expression of osteocalcin by the osteoid osteoma in comparison to normal adjacent bone tissue (Fig. 1b, c).

The second case was revealed by a 3-year persistent left hip nocturnal pain associated to quadricipital amyotrophy. Radiographs were normal. The bone scan showed increased uptake at the femoral upper extremity which was identified by CT scan as an osteoid osteoma of the lesser trochanter. This 22-year-old man had no medical history. Acetylsalicylic acid was the only medication. Surgical resection confirmed diagnosis and cured the patient.

Among the two controls, one was operated for anterior ligamentoplasty after sport injury. The other one was operated for meniscectomy. The three healthy volunteers were recruited from the general population. Both controls and healthy volunteers had no medical history and took no medication.



**Fig. 1** a Sacral axial CT showing the nidus of osteoid osteoma in the third right sacral hole. b Light microscopy of osteoid osteoma stained with HE (magnification 10×). c Light microscopy. Immunochimistry of osteoid osteoma with osteocalcin antibody (Biogenex #AM386-5M; 1:20). The nidus exhibits a strongly increased staining indicating an increased osteocalcin production in comparison to normal adjacent bone

**Table 1** Patients' baseline characteristics and osteocalcin, blood glucose, and bone turnover markers evolution

ID	Age (years)	Location	Body mass index (kg/m <sup>2</sup> )	HbA1C (%)	OCN (ng/ml)		Blood glucose (mmol/L)		CTX (pg/ml)		AP (U/L)		BSAP (µg/L)						
					Day 0	Day 1	%	Day 0	Day 1	%	Day 0	Day 1	%	Day 0	Day 1	%			
Case 1	24	Sacrum	21	5.1	26.0	10.0	-62	4.1	5.4	32	639	610	-5	37	41	11	9.2	9.5	3
Case 2	22	Femur	23	5.5	47.0	33.0	-30	4.8	5.5	15	1,023	1,034	1	51	46	-10	8.7	8.0	-8
Control 1	22	Ligamentoplasty	23	5.1	28.4	27.4	-4	4.5	4.5	0	957	837	-13	45	47	4	7.6	9.1	20
Control 2	31	Meniscectomy	25	5.1	25.0	25.0	0	4.4	4.9	11	858	1021	19	52	51	-2	8.5	8.4	-1
Volunteer 1	31	na	23	5.2	30.2	30.5	1	5.3	5.1	-4	698	803	15	55	51	-7	10.1	9.1	-10
Volunteer 2	38	na	24	-	25.9	25.4	-2	5.4	5.6	4	851	854	0	47	47	0	8.0	8.5	6
Volunteer 3	31	na	24	-	14.0	14.9	6	6.0	5.9	-2	365	326	-11	59	60	2	8.4	8.2	-2

### Bone turnover markers evolution

Osteoid osteoma resection has no effect on CTX and bone-specific alkaline phosphatase. Bone turnover markers were also not affected in controls and remained stable in healthy volunteers (Table 1).

### Osteocalcin and blood glucose evolution

Surgical resection of the tumor was followed by a drop of osteocalcin of 62% in case 1 and 30% in case 2, whereas it remained remarkably stable in controls, excluding any effect of anesthesia, and in healthy volunteers. Moreover, we observed in patients an increase in blood glucose of respectively 32% and 15% (Table 1).

### Uncarboxylated osteocalcin evolution

After osteoid osteoma resection, unOCN decreased in case 1 by 3.5 ng/mL and 1.4 ng/mL in case 2. On the other side, controls and healthy volunteers have no clear decrease in unOCN and variations are inferior to 0.5 ng/ml. At baseline, unOCN ratio was similar between cases (19% and 24%) and controls (19% both). One volunteer was in the same range at 18%. The two others were assessed lower at 9% and 8% (Table 2).

### Insulin resistance and $\beta$ cell activity

In controls, serum insulin levels remained stable, whereas in patients, insulin levels increased after resection. Case 1 rose from 5.5 to 11.3 mUI/L and case 2 from 16.8 to 20.8 mUI/L. In response to osteocalcin drop, insulin evolution corresponds to a decrease in  $\beta$  cell activity [7, 8] [ $\text{HOMA-}\beta = 20 \times \text{fasting insulin} / (\text{fasting glucose} - 3.5)$ ] in case 1 (from 183.3 to 118.9; -35%) and case 2 (from 258.5 to 208.0; -19%). Simultaneously, insulin resistance increased according to HOMA-R [7, 8] [ $\text{fasting glucose} \times$

fasting insulin/22.5] in case 1 (1.0 at T0 and 2.7 at T1; +170%) and case 2 (3.6 at T0 and 5.1 at T1; +42%). Thus, the drop of osteocalcin correlates with a reduction in  $\beta$  cell activity and an increase in insulin resistance.

### Discussion

This study which is limited to two cases shows that during the first 24 h, surgical resection of osteoid osteoma induces a drop of osteocalcin and an increase in serum blood glucose, whereas bone remodelling parameters assessed by CTX and BSAP were not affected. In the light of recent experimental data, a valuable candidate for an external control of OCN secretion by osteoblasts may be the sympathetic tone. Unfortunately, our study was not designed to assess sympathetic tone in our patients [9].

Interestingly, the drop of osteocalcin was also observed in unOCN with a strong decrease in case 1 and a milder one in case 2. This is consistent with the magnitude of the variations of total osteocalcin and blood glucose in these two cases. The fact that simultaneously to the decrease of unOCN, there was a proportionate increase in fasting blood glucose, is consistent with experiments previously reported in which wild-type mice treated with unOCN had a decrease in fasting blood glucose [6].

Medical treatment of osteoid osteoma relies on acetylsalicylic acid and NSAID to relief nocturnal pain. The effects on glycemia of these treatments represent a potential limitation to our study. Indeed, acetylsalicylic acid and NSAID improves glucose levels at high dose (7 g/day of acetylsalicylic acid) [10, 11]. Moreover, our patients were lean and non-diabetic. Recent studies on diabetic and obese patients showed that at conventional dose, salsalate improves fasting glucose, HbA1C, and glycemic response with less toxicity [12–15]. The potential mechanism of action is the inhibition of the Nuclear Factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) pathway independently of the cyclooxygenase inhibition

**Table 2** Evolution of uncarboxylated osteocalcin (unOCN) between baseline and after surgery

ID	Day 0			Day 1			Absolute variation of unOCN (ng/ml)
	OCN (ng/ml)	unOCN (ng/ml)	unOCN/OCN (%)	OCN (ng/ml)	unOCN (ng/ml)	unOCN/OCN (%)	
Case 1	26.5	5.1	19	9.5	1.6	17	-3.5
Case 1	47.9	11.6	24	35.0	10.2	29	-1.4
Control 1	28.4	5.4	19	27.4	5.4	21	0.0
Control 2	26.5	5.1	19	29.3	5.2	18	0.1
Volunteer 1	30.2	5.3	18	30.5	5.1	17	-0.2
Volunteer 2	25.9	2.3	9	25.4	2.7	11	0.4
Volunteer 3	14.0	1.2	8	14.9	1.7	11	0.5

[14]. To our knowledge, there is no reported data on salsalate and osteocalcin.

The fact that bone resorption marker (CTX) was not affected by the surgery is important. Indeed, Ferron et al. [16] have demonstrated that the acid pH present in the resorption lacunae decarboxylates osteocalcin into active uncarboxylated osteocalcin then released into the bloodstream. Mice with a high resorption have an improved glucose tolerance, while mice with a low resorption have an impaired glucose tolerance. Thus, bone resorption is a second source of unOCN. In our cases, we considered that the stable resorption released a constant amount of active osteocalcin and allowed us to study the direct osteoblast production.

We are fully aware that we were dealing with a limited number of cases. Nevertheless, these cases may be taken as a clinical proof of concept of the action of osteocalcin in humans. These data suggest that osteoid osteoma may be a benign osteocalcin secreting tumor, a kind of osteocalcinoma.

There is a growing body of correlative evidence suggesting that osteocalcin regulates glucose metabolism in human as it does in rodents. One would expect so since there is no example of a molecule identified as a hormone in rodents that has lost this feature in humans. These studies found that osteocalcin was negatively correlated with fasting plasma glucose, insulin, and glycohemoglobin A1c [17]. Beyond negative correlations with glucose metabolism, some studies also report negative correlations between osteocalcin and broader parameters like body mass index, insulin resistance, adipokine levels, and fat mass, suggesting a link with metabolic syndrome [18–27]. Our data provide direct support for the notion that in humans, uncarboxylated osteocalcin regulates blood glucose and energy metabolism.

**Acknowledgments** The authors acknowledge Patricia Ducey, Jacques Bejui-Hugues, Jean-Paul Carret, Vincent Pibarot, Damien Pourre, Philippe Bovier-Lapierre, Simone Arnaud, Laurence Chardon, Pawel Szulc, Franck Chotel, and Rémi Kohler for their help.

**Conflicts of interest** None.

## References

- Ducey P, Amling M, Takeda S, Priemel M, Schilling AF, Beil FT, Shen J, Vinson C, Rueger JM, Karsenty G (2000) Leptin inhibits bone formation through a hypothalamic relay: a central control of bone mass. *Cell* 100:197–207
- Karsenty G (2006) Convergence between bone and energy homeostases: leptin regulation of bone mass. *Cell Metab* 4: 341–348
- Lee NK, Sowa H, Hinoi E, Ferron M, Ahn JD, Confavreux C, Dacquin R, Mee PJ, McKee MD, Jung DY, Zhang Z, Kim JK, Mauvais-Jarvis F, Ducey P, Karsenty G (2007) Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton. *Cell* 130:456–469
- Confavreux CB (2011) Bone: from a reservoir of minerals to a regulator of energy metabolism. *Kidney Int* 79(Suppl 121): S14–S19
- Confavreux CB, Levine RL, Karsenty G (2009) A paradigm of integrative physiology, the crosstalk between bone and energy metabolisms. *Mol Cell Endocrinol* 310:21–29
- Ferron M, Hinoi E, Karsenty G, Ducey P (2008) Osteocalcin differentially regulates beta cell and adipocyte gene expression and affects the development of metabolic diseases in wild-type mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:5266–5270
- Heikkinen S, Argmann CA, Champy MF et al (2007) Evaluation of glucose homeostasis. *Curr Protoc Mol Biol* Chapter 29:Unit 29B 23
- Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC (1985) Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 28:412–419
- Hinoi E, Gao N, Jung DY, Yadav V, Yoshizawa T, Myers MG Jr, Chua SC Jr, Kim JK, Kaestner KH, Karsenty G (2008) The sympathetic tone mediates leptin's inhibition of insulin secretion by modulating osteocalcin bioactivity. *J Cell Biol* 183:1235–1242
- Hundal RS, Petersen KF, Mayerson AB, Randhawa PS, Inzucchi S, Shoelson SE, Shulman GI (2002) Mechanism by which high-dose aspirin improves glucose metabolism in type 2 diabetes. *J Clin Invest* 109:1321–1326
- Mork NL, Robertson RP (1983) Effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in conventional dosage on glucose homeostasis in patients with diabetes. *West J Med* 139:46–49
- Fleischman A, Shoelson SE, Bernier R, Goldfine AB (2008) Salsalate improves glycemia and inflammatory parameters in obese young adults. *Diabetes Care* 31:289–294
- Goldfine AB, Fonseca V, Jablonski KA, Pyle L, Staten MA, Shoelson SE (2010) The effects of salsalate on glycemic control in patients with type 2 diabetes: a randomized trial. *Ann Intern Med* 152:346–357
- Goldfine AB, Silver R, Aldhahi W, Cai D, Tatro E, Lee J, Shoelson SE (2008) Use of salsalate to target inflammation in the treatment of insulin resistance and type 2 diabetes. *Clin Transl Sci* 1:36–43
- Koska J, Ortega E, Bunt JC, Gasser A, Impson J, Hanson RL, Forbes J, de Courten B, Krakoff J (2009) The effect of salsalate on insulin action and glucose tolerance in obese non-diabetic patients: results of a randomised double-blind placebo-controlled study. *Diabetologia* 52:385–393
- Ferron M, Wei J, Yoshizawa T, Del Fattore A, DePinho RA, Teti A, Ducey P, Karsenty G (2010) Insulin signaling in osteoblasts integrates bone remodeling and energy metabolism. *Cell* 142: 296–308
- Iki M, Tamaki J, Fujita Y et al (2011) Serum undercarboxylated osteocalcin levels are inversely associated with glycemic status and insulin resistance in an elderly Japanese male population: Fujiwara-kyo Osteoporosis Risk in Men (FORMEN) Study. *Osteoporos Int* (in press)
- Bae SJ, Choe JW, Chung YE et al (2010) The association between serum osteocalcin levels and metabolic syndrome in Koreans. *Osteoporos Int* (in press)
- Garcia-Martin A, Cortes-Berdonces M, Luque-Fernandez I et al (2010) Osteocalcin as a marker of metabolic risk in healthy postmenopausal women. *Menopause* (in press)
- Hwang YC, Jeong IK, Ahn KJ, Chung HY (2009) The uncarboxylated form of osteocalcin is associated with improved glucose tolerance and enhanced beta-cell function in middle-aged male subjects. *Diabetes Metab Res Rev* 25:768–772

21. Kanazawa I, Yamaguchi T, Tada Y, Yamauchi M, Yano S, Sugimoto T (2011) Serum osteocalcin level is positively associated with insulin sensitivity and secretion in patients with type 2 diabetes. *Bone* 48:720–725
22. Kanazawa I, Yamaguchi T, Yamamoto M, Yamauchi M, Kurioka S, Yano S, Sugimoto T (2009) Serum osteocalcin level is associated with glucose metabolism and atherosclerosis parameters in type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 94:45–49
23. Kanazawa I, Yamaguchi T, Yamauchi M, Yamamoto M, Kurioka S, Yano S, Sugimoto T (2011) Serum undercarboxylated osteocalcin was inversely associated with plasma glucose level and fat mass in type 2 diabetes mellitus. *Osteoporos Int* 22:187–194
24. Kindblom JM, Ohlsson C, Ljunggren O, Karlsson MK, Tivesten A, Smith U, Mellstrom D (2009) Plasma osteocalcin is inversely related to fat mass and plasma glucose in elderly Swedish men. *J Bone Miner Res* 24:785–791
25. Pittas AG, Harris SS, Eliades M, Stark P, Dawson-Hughes B (2009) Association between serum osteocalcin and markers of metabolic phenotype. *J Clin Endocrinol Metab* 94:827–832
26. Saleem U, Mosley TH Jr, Kullo IJ (2010) Serum osteocalcin is associated with measures of insulin resistance, adipokine levels, and the presence of metabolic syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 30:1474–1478
27. Yeap BB, Chubb SA, Flicker L, McCaul KA, Ebeling PR, Beilby JP, Norman PE (2010) Reduced serum total osteocalcin is associated with metabolic syndrome in older men via waist circumference, hyperglycemia, and triglyceride levels. *Eur J Endocrinol* 163:265–272

## V- Perspectives

### 1) Résorption et fenêtre de dosages

De façon intéressante, le fait que la chirurgie de résection de l'ostéome ostéoïde n'affecte pas le niveau de résorption de ces hommes jeunes est important. En effet, il a été récemment démontré par Ferron *et al.* que l'acidification durant la résorption était responsable d'une décarboxylation de l'ostéocalcine et d'un relargage dans la circulation sanguine d'ostéocalcine active<sup>89</sup>. L'absence de modification de la résorption nous permet donc d'isoler l'action de l'ostéome.

Les dosages d'ostéocalcine sérique avant la chirurgie n'étaient pas anormalement élevés. Ceci peut correspondre à la taille très restreinte de ces tumeurs qui mesurent en moyenne 5 mm de diamètre. Cependant, on observe clairement une chute du dosage de l'ostéocalcine par rapport aux contrôles. Par analogie avec les autres tumeurs endocriniennes sécrétantes, on peut suggérer que le reste des ostéoblastes constituant la « glande osseuse » soit mis au repos. La scintigraphie osseuse réalisée lors des bilans pour ostéome ostéoïde va dans ce sens et montre une hyperfixation très localisée au niveau de l'ostéome.

Dans notre expérience clinique, la résection des ostéomes ostéoïdes chez l'homme jeune ne s'accompagne pas de décompensation diabétique ni de perturbation du bilan osseux à distance. Ceci nous avait suggéré lors du design de l'étude l'existence d'un mécanisme de compensation rapide de l'ostéocalcine et de la glycémie après résection de l'adénome. C'est la raison pour laquelle nous avons choisi de réaliser des dosages rapprochés, en postopératoire précoce, le lendemain de l'intervention. Pour des raisons techniques, nous n'avons pas de donnée concernant le tonus sympathique et son éventuelle adaptation chez ces patients.

### 2) Ostéome ostéoïde, ostéoblastome et technique de résection

Durant notre étude, nous avons eu accès à un autre cas d'ostéome ostéoïde également sécrétant mais dont les prélèvements furent réalisés à 48 heures d'intervalle, sans dosage de la glycémie et dont le sérum ne fut pas congelé. Ce cas n'a pu être exploité dans notre étude. La baisse observée d'ostéocalcine était relativement faible de 16 %. Il est possible que cela provienne du phénomène de correction rapide dont nous avons parlé précédemment. Un argument dans ce sens est l'analyse d'un autre cas pris en charge selon la technique du FROP (*Forage ResectiOn Percutane sous controle tomодensitometrique*)<sup>108</sup>. Durant cette procédure, la tumeur située dans la partie postérieure du cotyle de la hanche gauche en sous articulaire était très difficilement accessible sans provoquer d'effraction de la cavité articulaire. L'opérateur a dû se résoudre à pulvériser par fraisage l'ostéome ostéoïde. L'analyse anatomopathologique n'a donc pas été possible. En revanche, le dosage de la cinétique de l'ostéocalcine a montré un relargage d'ostéocalcine le lendemain matin suite à cette pulvérisation (+37%) et une rapide correction à J2 (retour à la normale). Cette observation est en faveur de la réalisation de dosage précoce postopératoire.

Il existe probablement une hétérogénéité parmi les ostéomes ostéoïdes avec des tumeurs effectivement sécrétantes et certaines qui ne le sont pas ou peu. Ainsi nous avons observé dans notre série, un cas atypique d'ostéome ostéoïde

développé chez une patiente âgée de 59 ans au niveau de son poignet. Ce cas atypique, bien que confirmé histologiquement, s'est révélé non sécrétant.

La parenté histologique entre ostéome ostéoïde et ostéoblastome suggère que les ostéoblastomes pourraient être également des adénomes sécrétants de l'ostéocalcine. Les comités d'éthique n'ayant pas été sollicités pour donner leur avis sur les enfants, nous n'avons pas d'autorisation pour réaliser cette étude chez eux. Habituellement les ostéoblastomes sont de taille beaucoup plus importante que les ostéomes ostéoïdes et il est légitime de penser que la sécrétion d'ostéocalcine serait plus importante. Un dosage préliminaire réalisé chez une patiente de 12 ans à New York, a montré une baisse de 37 % en 48 heures de l'ostéocalcine passée de 102ng/mL à 64ng/mL. L'analyse d'une éventuelle différence entre ostéoblastomes et ostéomes ostéoïdes chez l'enfant concernant la sécrétion d'ostéocalcine reste à réaliser.

### **3) Arguments indirects de l'action de l'ostéocalcine chez l'homme : corrélation avec le diabète et le syndrome métabolique**

Depuis la publication de l'article princeps montrant l'action de l'ostéocalcine sur le métabolisme glucidique chez la souris, plusieurs publications épidémiologiques réalisées chez l'homme apportent des preuves indirectes de l'action de l'ostéocalcine sur le contrôle du métabolisme énergétique. Globalement ces études ont montré que l'ostéocalcine était négativement corrélée avec la glycémie à jeun, l'hémoglobine glycosylée et positivement avec l'insuline circulante<sup>132-137</sup>.

Par-delà les corrélations négatives avec la glycémie et l'hémoglobine glycosylée, d'autres études rapportent des corrélations négatives entre ostéocalcine et l'indice de masse corporelle, l'insulinorésistance, la masse grasse, et les adipokines<sup>136, 138-141</sup>. Considérées ensemble, ces études évoquaient les différents traits du syndrome métabolique en lien avec le déficit d'insulinosécrétion et l'insulinorésistance. L'association entre ostéocalcine et syndrome métabolique a finalement été rapportée<sup>137, 142-144</sup>.

Ces études humaines sont concordantes avec le phénotype métabolique observé chez les souris déficientes en *ostéocalcine* (*Ocn*<sup>-/-</sup>) qui présentent une intolérance au glucose avec déficit de sécrétion en insuline, insulinorésistance, augmentation de leur masse grasse (fat pad) et hypogonadisme<sup>84</sup>.

## **C/ Association entre ostéocalcine, syndrome métabolique et calcifications aortiques abdominales chez l'homme dans l'étude MINOS**

### **I- Introduction**

#### **1) Syndrome métabolique : définition, physiopathologie et risque cardiovasculaire**

Le syndrome métabolique est un désordre métabolique très fréquent qui correspond à l'association de plusieurs facteurs de risque cardio-vasculaires chez un même individu<sup>145, 146</sup>. Le syndrome métabolique est un problème de santé publique de plus en plus préoccupant dans le monde entier favorisé par l'explosion de l'obésité dû à l'excès nutritionnel et à la réduction d'activité physique<sup>147</sup>. Il existe sans doute une susceptibilité génétique sous-jacente qui expliquerait les variations de prévalence du syndrome métabolique entre les différents groupes ethniques<sup>148</sup>. Dans les pays de l'Ouest, la prévalence du syndrome métabolique est estimée entre 34,5 et 39 %<sup>149</sup>. L'apparition d'un syndrome métabolique chez un individu n'est pas anodine. En effet, il existe en cas de syndrome métabolique un doublement du risque cardio-vasculaire et du risque de mortalité d'origine coronarienne à 10 ans. Ce risque augmente encore chez les patients présentant un syndrome métabolique et un diabète de type II<sup>150-152</sup>.

L'identification des patients présentant un syndrome métabolique est un enjeu important pour les médecins traitants qui doivent alors expliquer clairement à leurs patients l'importance du risque métabolique et mettre en place une prise en charge active intense du risque cardio-vasculaire. Cette prise en charge est basée à la fois sur les traitements mais aussi sur les modifications du style de vie avec notamment des actions portant sur la nutrition, l'activité physique et la perte de poids. Les efforts doivent également porter sur les autres facteurs de risque cardio-vasculaires modifiables comme par exemple la consommation de tabac. Cet enjeu de santé publique planétaire et la nécessité d'une identification rapide sur le terrain des patients présentant un syndrome métabolique a conduit les différentes sociétés savantes internationales à proposer une définition harmonisée en 2009 basée sur l'existence de trois critères diagnostiques parmi cinq pour poser le diagnostic de syndrome métabolique chez un patient donné<sup>153</sup>.

En Europe, les critères du syndrome métabolique pour un homme sont :

- un périmètre abdominal supérieur ou égal à 102 cm,
- une hypertension,
- une glycémie le matin supérieure ou égale à 100 mg par décilitre,
- un déficit de cholestérol HDL inférieur à 40 mg par décilitre,
- une hypertriglycéridémie supérieure à 150 mg par décilitre.

## 2) Calcifications aortiques : pathogénie et risque cardiovasculaire

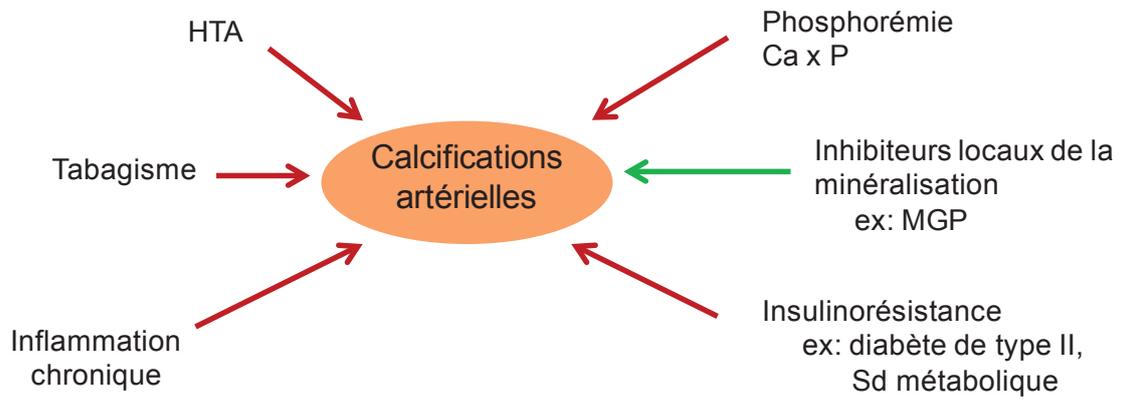
Les calcifications vasculaires sont une complication majeure cruciale du syndrome métabolique. Elles sont également très fréquentes dans l'athérosclérose, le diabète et l'insuffisance rénale<sup>154, 155</sup>. On distingue différentes calcifications vasculaires notamment les calcifications coronariennes et les calcifications abdominales aortiques. Les calcifications abdominales aortiques sont un prédicteur important de maladies cardio-vasculaires et de mortalité. En un sens les calcifications abdominales aortiques peuvent être considérées comme un marqueur intermédiaire du risque cardio-vasculaire<sup>156-159</sup>.

Le processus de calcification vasculaire est marqué par la transdifférenciation des cellules musculaires lisses de la média en cellules présentant un phénotype de type ostéoblastique comme en témoigne l'hyperexpression des gènes osseux spécifiques comme *Runx2* et *Osteopontin*. Ce phénomène de transdifférenciation mène à la minéralisation de la média. Les taux élevés de phosphore inorganique sérique favorisent ce processus de transdifférenciation<sup>160</sup>. Un des éléments clés de la régulation de l'homéostasie du phosphore est le FGF23 (fibroblast growth factor 23) qui est une hormone synthétisée par les ostéocytes. Le FGF23 agit sur les reins pour stimuler l'excrétion urinaire de phosphate. Dans l'insuffisance rénale chronique, le taux sérique de FGF23 augmente précocement pour maintenir une phosphorémie normale. À la phase terminale de l'insuffisance rénale, la phosphorémie augmente malgré les taux élevés de FGF23 et contribue au développement des calcifications vasculaires<sup>161</sup>. La régulation du phosphore constitue un premier élément d'interaction entre physiologie osseuse et calcifications vasculaires.

Un second exemple d'interaction entre os et parois vasculaires est l'existence dans la paroi vasculaire et l'os d'un inhibiteur local identique de la minéralisation de la matrice extracellulaire. Il s'agit d'une protéine carboxylée appelée Matrix Gla-protein (MGP) dont la fonction est de prévenir la survenue de calcifications ectopiques. Les souris déficientes en *Mgp* (*Mgp*<sup>-/-</sup>) présentent des calcifications artérielles massives<sup>162</sup>. La restauration spécifique de *Mgp* dans la paroi artérielle suffit à prévenir la calcification de la paroi vasculaire. En outre, l'hyperexpression de *Mgp* spécifiquement dans l'os de ces animaux ne prévient pas la survenue de calcifications artérielles mais en revanche empêche la minéralisation du tissu osseux<sup>162</sup>. Ces résultats biologiques font écho en clinique aux données concernant l'utilisation d'anticoagulants anti-vitamine K qui empêchent la gammacarboxylation de MGP et la rendent donc inactive. Les études montrent, qu'en présence d'antivitamines K, les patients ont plus de calcifications vasculaires.<sup>163, 164, 165, 166</sup>

L'apparition et le développement des calcifications aortiques impliquent de multiples facteurs parmi lesquels l'hypertension, la consommation de tabac, l'inflammation chronique, le produit phospho-calcique ou encore des anomalies du bilan lipidique<sup>167</sup>. Figure 11. L'état d'insulino-résistance est un autre facteur clé du processus de calcification vasculaire<sup>167</sup>. Les maladies caractérisées par un tableau d'insulinorésistance comme le diabète de type II ou le syndrome métabolique ont une morbidité et une mortalité cardiovasculaire élevées<sup>150-152, 168</sup>.

**Figure 11 :** facteurs influençant la minéralisation ectopique de la paroi artérielle<sup>160, 162, 167</sup>



## II- Hypothèse de travail

Un des mécanismes actuellement considéré comme essentiel est l'apparition d'un déficit d'insulinosécrétion, d'une augmentation drastique de l'insulinorésistance associée à une élévation des acides gras circulant et d'une adiponectine circulante basse <sup>145</sup>. La similitude des mécanismes physiopathologiques du syndrome métabolique avec la description du phénotype métabolique des souris déficientes en *ostéocalcine* (*Ocn*<sup>-/-</sup>) <sup>84</sup> est troublante. Les démonstrations génétiques et les corrélations négatives entre ostéocalcine et syndrome métabolique récemment décrites chez l'homme <sup>137, 142, 143, 144</sup> placent l'ostéocalcine comme un sérieux candidat pour la compréhension du syndrome métabolique et potentiellement comme une cible thérapeutique dans le futur.

Étant donné que le principal risque du syndrome métabolique est le risque cardio-vasculaire, il est logique d'étudier l'existence d'un lien entre ostéocalcine et calcification vasculaire. À notre connaissance il n'existe aucune étude rapportée concernant la corrélation entre ostéocalcine et calcifications abdominales aortiques <sup>169</sup>.

Pour répondre à cette question, nous avons réalisé une analyse transversale des calcifications vasculaires aortiques au sein de la cohorte MINOS qui regroupe des hommes âgés de 51 à 85 ans.

### III- Résumé

**Objectif.** Analyser chez l'homme le lien entre ostéocalcine, syndrome métabolique et calcifications abdominales aortiques.

**Matériels et méthodes.** MINOS est une étude de l'ostéoporose masculine réalisée chez des hommes âgés de 51 à 85 ans recrutés parmi les adhérents de la Société de Secours Minières de Bourgogne (SSMB). Les sujets présentant une maladie osseuse, une cirrhose, une hémochromatose ou recevant un traitement à visée osseuse étaient exclus. L'analyse transversale actuelle a été réalisée chez les sujets ayant un dosage d'ostéocalcine le matin à jeun disponible à l'inclusion. La définition du syndrome métabolique utilisée est celle basée sur les critères consensus communs récemment publiés<sup>153</sup>. La mesure des calcifications abdominales aortiques a été réalisée sur les radiographies simples de la colonne lombaire de profil selon le score semi-quantitatif de Kauppila<sup>170</sup>.

**Résultats.** 798 patients âgés en moyenne de 65,3 ans avec un BMI de 28,3 kg/m<sup>2</sup> ont été inclus. 25% des patients sont hypertendus et 7% ont un diabète. Plus de 2/3 des patients sont des fumeurs ou des ex-fumeurs.

- Il existe une corrélation négative entre l'ostéocalcine et la glycémie à jeun ( $r = -0.22$ ;  $p < 0.001$ ) qui persiste après ajustement sur l'âge et l'indice de masse corporelle. La glycémie à jeun est corrélée avec l'indice de masse corporelle mais pas avec les marqueurs du remodelage osseux.
- Les patients présentant un syndrome métabolique ont une ostéocalcine significativement plus basse et d'autant plus basse que le syndrome métabolique est sévère, basé sur le nombre de critères présents de la définition. Un taux élevé d'ostéocalcine est associé à une plus faible prévalence du syndrome métabolique (OR 95% d'intervalle de confiance [95%CI] = 0.82 [0.68-0.96] par augmentation de SD).
- L'ostéocalcine diminue progressivement avec les tertiles de calcifications abdominales aortiques. La moyenne d'ostéocalcine est plus basse ( $p < 0.005$ ) chez les patients avec des calcifications aortiques sévères (score CAA > 4). Un taux sérique élevé d'ostéocalcine est associé à une moindre prévalence de calcifications aortiques sévères (OR = 0.78 [0.64-0.94] par augmentation de SD;  $p = 0.01$ ) alors que comme attendu, l'âge, le tabac, la phosphorémie l'aggravent. Dans une autre analyse de régression logistique pas à pas incluant cette fois en plus les autres marqueurs du remodelage osseux (CTX, P1NP, phosphatases alcalines osseuses), l'ostéocalcine est le seul marqueur à rester significativement associé au score de calcification aortique (OR = 0.80 [0.65-0.77] par augmentation de SD;  $p = 0.02$ ).

**Conclusion.** Nous montrons pour la première fois chez l'homme âgé que l'ostéocalcine basse est associée à une prévalence plus élevée de calcifications aortiques abdominales sévères. Cette étude supporte le rôle de l'ostéocalcine sur le métabolisme énergétique observé chez la souris et suggère que l'ostéocalcine pourrait être un indicateur de risque cardiovasculaire indépendant.

#### **IV- Article**

### **Serum osteocalcin is associated with metabolic syndrome and abdominal aortic calcifications in older men: the MINOS study.**

**Confavreux CB**, Szulc P, Boutroy S, Varennes A, Vilayphiou N, Goudable J, Chapurlat RD.

*Soumis*

## **Serum osteocalcin is associated with metabolic syndrome and abdominal aortic calcifications in older men: the MINOS Study**

Cyrille B. Confavreux<sup>(1)</sup>, Pawel Szulc<sup>(1)</sup>, Stéphanie Boutroy<sup>(1)</sup>, Annie Varennes<sup>(2)</sup>, Nicolas Vilayphiou<sup>(1)</sup>, Joelle Goudable<sup>(3)</sup> and Roland D. Chapurlat<sup>(1)</sup>

(1) INSERM U1033 – Université de Lyon, Department of Rheumatology, Hôpital Edouard Herriot, Hospices Civils de Lyon, Lyon, 69003 FRANCE

(2) Université de Lyon, Central Biochemical Laboratory, Hôpital Edouard Herriot, Hospices Civils de Lyon, Lyon, 69003 FRANCE

(3) INSERM U1060 – Université de Lyon, Lyon, FRANCE

**Abbreviated title:** association of osteocalcin and aortic calcifications.

[cyril.confavreux@inserm.fr](mailto:cyril.confavreux@inserm.fr)  
[pawel.szulc@inserm.fr](mailto:pawel.szulc@inserm.fr)  
[stephanie.boutroy@inserm.fr](mailto:stephanie.boutroy@inserm.fr)  
[annie.varennes@chu-lyon.fr](mailto:annie.varennes@chu-lyon.fr)  
[nicolas.vilayphiou@inserm.fr](mailto:nicolas.vilayphiou@inserm.fr)  
[joelle.goudable@chu-lyon.fr](mailto:joelle.goudable@chu-lyon.fr)  
[roland.chapurlat@inserm.fr](mailto:roland.chapurlat@inserm.fr)

**Corresponding author:**

Cyrille B. CONFAVREUX, MD  
Service de Rhumatologie – INSERM UMR1033  
Pavillon F  
Hôpital Edouard Herriot  
5 place d'Arsonval  
69003 Lyon,  
FRANCE  
Phone +33 4 72 11 74 82  
Fax +33 4 72 11 74 83  
[cyril.confavreux@inserm.fr](mailto:cyril.confavreux@inserm.fr)

**Reprint requests** to Cyrille B. CONFAVREUX

**Word count:** abstract 246 / text 2756

**Number of figures:** 4 black/white. 0 color.

**Conflict of Interest Page :**

All authors have no conflicts of interest.

---

**Date:** 30 Nov 2011 07:49:18 -0500 [30.11.2011 13:49:18 CET]

---

**De:** JBMR <manuscript@asbmr.org>

---

**À:** "Cyrille B. CONFAVREUX" <cyril.confavreux@inserm.fr>

---

**Sujet:** Submission Confirmation

---

Serum osteocalcin is associated with metabolic syndrome and abdominal aortic calcifications in older men: the MINOS study.

Cyrille B. CONFAVREUX, M.D.; Pawel Szulc, M.D. PhD; Stéphanie Boutroy, PhD; Annie Varennes; Nicolas Vilayphiou, PhD; Joelle Goudable, M.D. PhD; Roland Chapurlat, M.D. PhD

Dear Dr. CONFAVREUX:

Thank you for submitting your manuscript to the Journal of Bone and Mineral Research (JBMR).

Please note that the JBMR is transitioning to a new online submission system and will not be able to accept initial submissions made using Editorial Manager after December 31, 2010.

If your manuscript was submitted after December 31, 2010, it will need to be resubmitted to our new system, found here: <http://mc.manuscriptcentral.com/asbmr>. Thank you for your understanding and cooperation.

If your manuscript was submitted on or before December 31, 2010, within the next 3 business days, the ASBMR publications staff will ensure that your submission is complete, after which you should receive an email with your JBMR manuscript number. Please contact the ASBMR publications office if you do not receive a manuscript number within 3 business days.

Questions about the status of your manuscript, our review process, author forms, or submission requirements may be directed to the ASBMR publications staff via email to [manuscript@asbmr.org](mailto:manuscript@asbmr.org).

Sincerely yours,  
Thomas L. Clemens, Ph.D.  
Editor-in-Chief  
Journal of Bone and Mineral Research  
[manuscript@asbmr.org](mailto:manuscript@asbmr.org)

---

**Abstract**

**Introduction.** In mice, osteocalcin is a hormone secreted by osteoblast and regulating energy metabolism. The *Osteocalcin* deficient mice phenotype with impaired glucose tolerance, overweight and high triglycerides, suggests a possibly increased cardiovascular risk. Therefore, we analyzed in humans the link between osteocalcin, metabolic syndrome (MetS) and abdominal aortic calcifications (AAC).

**Material and methods.** The MINOS cohort consists of 798 men aged 51-85. The current cross-sectional analysis used the harmonized diagnosis criteria of MetS definition published in 2009. Kauppila's abdominal aortic calcification semi-quantitative score (AACS) was calculated from the lumbar spine radiographies.

**Results.** Osteocalcin was negatively correlated to fasting blood glucose ( $r = -0.22$ ;  $p < 0.001$ ). The most severe forms of MetS were associated with the lowest osteocalcin concentrations. The highest osteocalcin levels were associated with lower prevalence of MetS (OR 95% confidence interval [95%CI] = 0.82 [0.68-0.96] per SD increase). Osteocalcin decreased across tertiles of AACS and was lower in men with more calcifications (AACS > 4) ( $p < 0.005$ ). The highest serum osteocalcin concentrations were associated to a lower prevalence of high calcification score (OR = 0.78 [0.64-0.94] per SD increase;  $p = 0.01$ ). In a forward stepwise logistic regression including other bone turnover markers, osteocalcin was the only marker significantly associated with the aortic calcification score (OR = 0.80 [0.65-0.77] per SD increase;  $p = 0.02$ ).

**Conclusion.** In older men, the lowest osteocalcin concentrations were associated with higher prevalence of MetS and more severe AAC. This study supports the role of osteocalcin in energy metabolism and suggests that serum osteocalcin level might be an independent indicator of cardiovascular risk.

**Key words:** abdominal aortic calcification, diabetes, men, metabolic syndrome, osteocalcin.

## Introduction

The aortic calcification process involves hypertension, tobacco consumption, chronic inflammation, lipid abnormalities and other factors (1). There are also interactions between bone physiology and vascular calcification. For instance, fibroblast growth factor 23 (FGF23), synthesized by osteocytes, increases urinary phosphate excretion. In chronic kidney disease, FGF23 serum level increases early to maintain phosphatemia. In late stage renal disease, phosphatemia rises (despite markedly increased FGF23 levels) and contributes to the development of vascular calcifications (2). During this process, the vascular smooth muscle cells in the media undergo a transdifferentiation into osteoblast-like cells (confirmed by the up-regulation of bone specific genes such as *Runx2* and *Osteopontin*) that leads to media mineralization. High inorganic phosphate serum level favors this transdifferentiation process (3).

A second interaction between bone and vascular metabolism is regulation of extracellular matrix mineralization by the same proteins expressed in bone and arterial wall. Matrix Gla-protein (MGP) is a gammacarboxylated protein which prevents ectopic calcifications. The deletion of *Mgp* in mice induces extensive arterial mineralization (4). The specific restoration of *Mgp* expression in arteries rescues the vascular calcification phenotype (4). On the other side, the specific restoration of *Mgp* only in bone prevents its mineralization. Vitamin K antagonists prevent MGP gammacarboxylation and impair its function.

Insulin resistance is another key aspect of the aortic calcification process (1). Diseases characterized by insulin resistance, such as type 2 diabetes mellitus and metabolic syndrome (MetS), have elevated cardiovascular morbidity and mortality (5-8). MetS is characterized by hypertension, insulin resistance and lower insulin secretion, which are associated with elevated circulating fatty acids, abdominal obesity and low adiponectin (9). We were

questioned by the similarities between MetS and the recently described functions of osteocalcin based on mouse genetics. *Osteocalcin* deficient mice phenotype recapitulates MetS even when on regular diet with impaired glucose tolerance, increased visceral fat mass and high triglycerides (10). Indeed osteocalcin promotes insulin  $\beta$ -cell secretion,  $\beta$ -cell proliferation and reduces insulin resistance. This initial description showing that bone is an endocrine organ regulating energy metabolism (11) had been strengthened by the demonstration that insulin signalling in osteoblasts favours osteoblast differentiation and osteocalcin production (12). It highlights the existence of a bone-pancreas endocrine loop (13). In addition, in some human studies, lower osteocalcin concentration was found in patients with MetS (14-17).

Therefore, the primary aim of this study was to assess cross-sectionally, in a cohort of older men, the association between serum osteocalcin level and abdominal aortic calcification (AAC) which is a strong predictor of cardiovascular disease and mortality (18,19). The secondary aim was to assess the association of circulating osteocalcin with fasting blood glucose and MetS.

## **Materials and methods**

### *Description of the cohort*

The MINOS study is a study of the epidemiology of osteoporosis and its determinants in men (20). It is a collaboration between INSERM and Société de Secours Minière de Bourgogne (SSMB), one of the largest local health insurance companies. The study was accepted by the local ethic committee and performed in accordance with the Helsinki declaration revised in 1983. The study took place in Montceau les Mines, a French city of 35,000 inhabitants. Patients aged 51-85 were recruited in 1995-96 by random invitations sent to men insured by SSMB. Out of the 3400 invitations, 841 men agreed to participate and provided informed consent. The present study is a cross-sectional analysis of baseline data and has been carried out in 798 patients who underwent blood collection at baseline.

### *Clinical data*

At enrolment, patients filled out an interviewer-administered epidemiological questionnaire to assess lifestyle and health status. Cigarette smoking was self-reported and classified as current, former or never-smokers. Alcohol intake was quantified as the average quantity of alcoholic beverages drunk weekly. Physical activity (leisure sport activity, gardening, walking) was calculated on the basis of the overall amount of time (hrs/week). Co-morbidities (diabetes, hypertension, ischemic heart disease) and current medication including vitamin K antagonists were self-reported, dichotomized as yes/no and not further ascertained. Body weight, height and abdomen perimeter were measured according to a standardized procedure.

### *Biochemical measurements*

Fasting serum were collected at baseline and stored at -80°C until measurements.

Serum calcium, phosphorus, albumin and creatinine were assessed using standard laboratory methods. Glucose was measured by the hexokinase method (Modular Analyzer, Roche, Meylan, France).

Serum total osteocalcin was measured with a human-specific two site immunoradiometric assay (IRMA, ELSA-OSTEO; CIS Bio International, Bagnols sur Cèze, France). Intra- and interassay coefficients of variation (CV) were  $\leq 4\%$  and  $\leq 6\%$  respectively and the sensitivity was 0.08nM/L. Bone formation was assessed by bone-specific alkaline phosphatase (BSAP) (Alkphase-B™ Metra Bio Systems Inc, Mountain View CA-USA) and N-terminal propeptide of type I procollagen (P1NP) (Intact PINP, Farnos Diagnostica, Uppsala Sweden). Bone resorption was assessed using serum levels of C-terminal telopeptide of type-I collagen ( $\beta$ CTX) (Elecys<sup>®</sup>; Roche Diagnostic). Serum 25-hydroxycholecalciferol (25OHD) was measured by radioimmunoassay (RIA) which excludes any interference with lipids (Inctar Corp, Stillwater, MN USA). Serum total testosterone and total 17 $\beta$  estradiol were measured by tritiated RIA after diethylether extraction. Sex hormone-binding globulin (SHBG) was assessed by IRMA (125 I SBP Coatria, Bio-Mérieux, Marcy l'Etoile France). Triglycerides (TGs) were measured by colorimetric test (Modular Analyzer, Roche) with detection limit of 4 mg/dL and interassay CV of 1.5%. HDL-cholesterol was measured by homogenous enzymatic colorimetric test (Modular Analyzer, Roche) with a detection limit of 3 mg/dL and interassay CV of 0.6 to 0.95%. Details about each method have already been published previously (21,22).

#### *Vascular calcification assessment*

Abdominal aortic calcifications (AAC) were assessed by the semi-quantitative method described by Kauppila from lateral radiographs of lumbar spine (23). Briefly, the calcifications of the anterior and posterior wall of the aorta, adjacent to the first four lumbar

vertebrae, are evaluated. Boundaries are defined by the midpoint of the intervertebral space. Semi-quantitative severity scores (0-3) for each segment are added to yield the global abdominal aortic calcification score (AACS), ranging from 0 to 24. Intraobserver reproducibility assessed by intraclass correlation coefficient (ICC) was 0.92-0.95. For interobserver reproducibility, ICC was 0.91.

#### *Definition of metabolic syndrome*

We used the recent harmonized definition of MetS (24), requiring the presence of three abnormal findings among the following five: elevated fasting glucose  $\geq 100$  mg/dL), elevated blood pressure (systolic  $\geq 130$  mmHg and/or diastolic  $\geq 85$  mmHg), elevated triglycerides ( $\geq 150$  mg/dL), reduced HDL-cholesterol ( $< 40$  mg/dL) and elevated waist circumference (European threshold:  $\geq 102$  cm).

#### *Statistical analysis*

All calculations were performed using SPSS 20.0 software version (IBM Corporation, Armonk, NY, USA). As osteocalcin, blood glucose, AACS and bone turnover markers displayed a skewed distribution, they were log-transformed. Data are presented as mean  $\pm$  SD or as median and interquartile range [IQ]. Correlations were assessed using simple and partial Pearson's correlation coefficients. Correlation coefficients  $> 0.2$  were considered biologically relevant and included in multivariate models. Bivariate comparisons were made using t-test. Multivariate adjusted comparison of log-transformed osteocalcin across the modalities of the categorical variables was performed using analysis of covariance with post-hoc analysis (Scheffe test). The association between the presence of MetS and standardized log-transformed osteocalcin was assessed using logistic regression adjusted for age, 25OHD and testosterone (all continuous), tobacco consumption, sport activity (classes). Because of multi-

colinearity, we excluded from the model body mass index (BMI), hip-waist ratio and height that were significantly correlated to the abdomen perimeter.

A “high calcification sub-group” was defined as the highest tertile of AACS ( $>4$ ). Bivariate comparisons between AACS $>4$  and AACS $\leq 4$  groups were performed using t-tests for continuous variables and using chi-square test for categorical variables. The association between severe AACS ( $>4$  vs  $\leq 4$ ) and standardized log-transformed osteocalcin was assessed using the logistic regression model adjusted for age, 25OHD, testosterone, serum phosphorus, triglycerides, HDL-cholesterol, serum creatinine (all continuous), hypertension, vitamin K antagonist use (yes/no), smoking and sport activity (classes). In order to assess which bone marker was most strongly associated with AACS, we performed a stepwise logistic regression model with the previous variables including osteocalcin and other bone turnover markers ( $\beta$ CTX, BSAP, P1NP). Finally, prevalence of AACS $>4$  was compared across the quartiles of serum osteocalcin using chi-square test. The logistic regression model was repeated with osteocalcin dichotomized as the first quartile vs the three higher quartiles combined adjusting for the same confounding variables as above. All p values were two-tailed, and values of  $<0.05$  were considered significant.

## Results

### *Baseline characteristics.*

At baseline, 798 men had osteocalcin measurements. Their average age was 65.3 years and their average BMI was 28.0 kg/m<sup>2</sup> (**Table 1**). Nearly 25% self-reported a high blood pressure and 7% diabetes. More than two thirds of the patients were current or former smoker and 15% had self-reported ischemic heart disease.

### *Osteocalcin and blood glucose.*

Blood glucose was positively correlated to BMI ( $r= 0.26$ ;  $p<0.001$ ) and negatively correlated to osteocalcin ( $r= -0.22$ ;  $p<0.001$ ) (**Fig. 1**). Osteocalcin remained significantly correlated to blood glucose ( $r= -0.19$ ;  $p<0.001$ ) after adjustment for age and BMI. BMI remained correlated with blood glucose after adjustment for age and osteocalcin ( $r= 0.23$ ;  $p<0.001$ ). Simple correlation coefficients of blood glucose with BSAP, P1NP and  $\beta$ CTX were  $< | 0.15 |$ .

### *Osteocalcin and other metabolic variables.*

Osteocalcin was slightly but significantly ( $r= | 0.08 |$  to  $| 0.15 |$ ;  $p<0.02$  to  $<0.001$ ) correlated with BMI, hip-waist ratio, physical activity, 25OHD, triglycerides, 17 $\beta$ -estradiol and SHBG. There was no significant association with age, total cholesterol, HDL-cholesterol and testosterone ( $r=0.01$  to  $0.05$ ;  $p>0.05$ ).

### *Osteocalcin and metabolic syndrome.*

With the above mentioned thresholds for the components of MetS, osteocalcin was lower in patients with elevated blood glucose and with an elevated waist circumference (**Table 2**).

There was a non-significant trend to lower osteocalcin in men with elevated triglycerides ( $p=0.07$ ).

Thirty percent of the cohort had MetS, defined as  $\geq 3$  criteria out of 5. Osteocalcin was significantly lower in patients with MetS than in normal individuals ( $p=0.01$ ). In patients with MetS, the higher the number of the Mets traits, the lower was the average osteocalcin level (**Fig. 2A**). In the multiple logistic regression model, higher osteocalcin levels were associated with lower prevalence of MetS (OR 95% confidence interval [95%CI] =0.82 [0.68-0.96] per SD increase;  $p=0.016$ ) (**Fig. 3**). Highest levels of testosterone were also associated with a reduced risk of MetS (OR=0.50 [0.41-0.61] per SD increase;  $p<0.001$ ).

#### *Osteocalcin and abdominal aortic calcifications.*

In the whole group, the median AACS was 2/24. After adjustment for age, smoking, physical activity, hypertension, vitamin K antagonist therapy, triglycerides, 25OHD, testosterone, and phosphorus, the average osteocalcin concentration was 0.41 SD lower ( $p<0.005$ ) in the highest AACS tertile ( $>4$ ) compared to the lowest tertile (AACS=0) (**Fig. 2B**). In the multivariable model, osteocalcin level did not differ between the two lowest tertiles ( $p=0.32$ ). Median [IQ] osteocalcin was lower in the high calcification group (AACS $>4$ ) compared with men with AACS $\leq 4$  (17.5 ng/mL [8.0] vs 18.5 ng/mL [7.5],  $p<0.005$ ). Patients with AACS $>4$  were older, more sedentary and more frequently self-reported hypertension (36% vs 19%;  $p<0.001$ ), ever-smoking (83% vs 61%;  $p<0.001$ ) and vitamin K antagonist therapy (7% vs 2.5%;  $p<0.005$ ) than patients with AACS $\leq 4$ . Their serum levels of phosphorus ( $33.8 \pm 4.6$  mg/L vs  $32.5 \pm 4.7$  mg/L;  $p=0.001$ ), Ca x P ion product ( $3291 \pm 465$  vs  $3153 \pm 506$ ;  $p=0.001$ ) and triglycerides ( $2.1 \pm 1.2$  mg/dL vs  $1.9 \pm 1.0$  mg/dL;  $p=0.006$ ) were also higher (vs AACS $\leq 4$ ). By contrast, their serum levels of 25OHD ( $25.1 \pm 11.5$  ng/mL vs  $28.1 \pm 11.5$  ng/mL;  $p=0.001$ )

and total testosterone ( $16.9 \pm 6.9$  nmol/L vs  $18.2 \pm 6.9$  nmol/L;  $p=0.012$ ) were significantly lower (vs  $AACS \leq 4$ ).

In the logistic regression model adjusted for confounders, higher osteocalcin was significantly associated to a lower prevalence of high calcification ( $AACS > 4$ ) (OR=0.78 [0.64-0.94] per SD increase;  $p=0.01$ ) (**Fig. 4**). Age, hypertension, tobacco consumption and serum phosphorus were positively associated with  $AACS > 4$ . Osteocalcin remained significantly associated with  $AACS > 4$  after additional adjustment for diabetes (OR=0.82 [0.68-0.99] per SD increase;  $p=0.04$ ) but barely failed to reach statistical significance after adjustment for blood glucose (OR=0.83 [0.68-1.01] per SD increase;  $p=0.06$ ).

As expected, osteocalcin was correlated with other bone turnover markers such as BSAP, PINP and  $\beta$ CTX ( $r=0.59$  to  $0.72$ , all  $p < 0.001$ ). Thus, we tested whether osteocalcin was specifically associated to AAC. In a stepwise logistic regression model including the previous confounders as well as osteocalcin, BSAP, PINP and  $\beta$ CTX, osteocalcin was the only bone marker retained in the model (OR=0.80 [0.65 – 0.97];  $p=0.02$ ) together with age, hypertension, tobacco consumption, triglycerides and phosphorus.

Prevalence of  $AACS > 4$  was higher in the lowest quartile of osteocalcin compared with the upper quartiles (Q1: 43%, Q2: 32%, Q3: 27%, Q4: 31%;  $df=3$ ,  $\chi^2 = 11.62$ ,  $p < 0.01$ ). In the multi-adjusted logistic regression model, the lowest quartile of osteocalcin was associated with higher prevalence of  $AACS > 4$  compared with the three upper quartiles (OR=1.72 [1.14-2.60];  $p < 0.01$ ).

## Discussion

In this cohort of older men, we found that higher serum osteocalcin level was independently associated with lower prevalence of MetS and less severe AAC. To our knowledge, this is the first report of a link between osteocalcin and AAC in community-dwelling men.

These results are consistent with the phenotype of *osteocalcin* deficient mice (10). Indeed, among the five MetS criteria, osteocalcin was specifically correlated with high blood glucose and elevated abdominal perimeter. There is a growing body of evidence that osteocalcin regulates glucose metabolism in humans. Osteocalcin was negatively correlated to blood glucose and glycohemoglobin A1c (15,25-27) as well as with other metabolic variables such as adipokines, elevated BMI or fat mass (28-31). Here, we report higher prevalence of MetS in men with low serum osteocalcin levels, which is consistent with other recent studies (14-17). Moreover, we have recently shown that after surgical resection of osteoid osteoma in young men, serum osteocalcin level decreased, whereas blood glucose increased providing some direct evidence of the action of osteocalcin in humans (32). Our results strengthen the concept that bone regulates energy metabolism and that the osteoblast-secreted hormone, osteocalcin, is negatively correlated to MetS, probably through its action on glucose and lipid metabolism. In the context of the experimental studies, our data also suggest that osteocalcin may protect from MetS and vascular calcifications.

Here, one step further, we showed that osteocalcin was correlated to the severity of MetS and of AAC. Previously, severity of MetS, defined as the number of traits present in one individual, was associated with the severity of subclinical atherosclerosis assessed with other surrogate measurements (e.g. pulse wave velocity, arterial index) (33). Furthermore, in 92 patients with essential hypertension, higher undercarboxylated osteocalcin was correlated with increased calcification in the common carotid artery assessed by ultrasound (38).

However, the study design did not allow the inclusion of multiple variables for adjustment in their regression model. The association of osteocalcin and AAC was also analyzed in a group of community-living women aged  $\geq 65$  from the Study of Osteoporotic Fractures (SOF) cohort. The authors failed to find any association; however, bone markers were not measured in fasting morning samples (34). This may also be due to a gender difference, since in rodents, the metabolic phenotype in female is less pronounced. Indeed, osteocalcin acts on Leydig cells to regulate testosterone and fertility in males, whereas female do not have any fertility phenotype (35). Interestingly, a significant negative correlation between osteocalcin level and aortic calcification severity was found in a small group of men and women with familial hypercholesterolemia (36).

Osteocalcin may be involved in the aortic calcification process indirectly by its action on insulin and insulin resistance. One can speculate that osteocalcin acts through its action on adiponectin as it was reported in mice (10) and in chronic kidney disease patients (37). Adiponectin is an adipokine, secreted by adipocytes, that possesses protective cardiovascular effects and anti-inflammatory properties. Adiponectin acts on vascular smooth muscle cells (VSMC) in the media of artery and prevent their differentiation into osteoblast-like cells (38). Currently, a direct action of osteocalcin on the vascular calcification process as a secreted hormone is unknown and further experiments are needed.

Our study has limitations. The cohort includes predominantly lower and middle-class Caucasian men and the data cannot be extrapolated on women or men from other ethnic groups. They were recruited in a small town and its population may not be representative of the general French population. In this cross-sectional study, cause-effect relationships cannot be firmly established. We assessed the calcifications only in the abdominal aorta and it is not sure whether these results can be extrapolated to other arteries. Kauppila's score enables the assessment of the aortic calcification extension, but not the arterial calcium content. Smoking

and co-morbidities were self-reported and not further ascertained. Serum samples were collected 15 years ago and, although they were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ , the measurement of undercarboxylated osteocalcin would appear uncertain.

In conclusion, we found that higher osteocalcin levels were independently associated with lower prevalence of MetS and lower AACS in a cohort of community-dwelling older men. This suggests that serum osteocalcin level may be an independent indicator of cardiovascular risk; however, this speculation has to be verified in prospective studies.

### **Contributors.**

PS recruited patients. CC, PS SB, NV and RC were involved in study design, statistical analysis and manuscript writing. AV and JG did biological assessments.

## References

1. Giachelli CM 2004 Vascular calcification mechanisms. *J Am Soc Nephrol* **15**(12):2959-64.
2. Juppner H 2011 Phosphate and FGF-23. *Kidney Int Suppl* (121):S24-7.
3. Jono S, McKee MD, Murry CE, Shioi A, Nishizawa Y, Mori K, Morii H, Giachelli CM 2000 Phosphate regulation of vascular smooth muscle cell calcification. *Circ Res* **87**(7):E10-7.
4. Murshed M, Schinke T, McKee MD, Karsenty G 2004 Extracellular matrix mineralization is regulated locally; different roles of two gla-containing proteins. *J Cell Biol* **165**(5):625-30.
5. Hu G, Qiao Q, Tuomilehto J, Balkau B, Borch-Johnsen K, Pyorala K 2004 Prevalence of the metabolic syndrome and its relation to all-cause and cardiovascular mortality in nondiabetic European men and women. *Arch Intern Med* **164**(10):1066-76.
6. Isomaa B, Almgren P, Tuomi T, Forsen B, Lahti K, Nissen M, Taskinen MR, Groop L 2001 Cardiovascular morbidity and mortality associated with the metabolic syndrome. *Diabetes Care* **24**(4):683-9.
7. Lakka HM, Laaksonen DE, Lakka TA, Niskanen LK, Kumpusalo E, Tuomilehto J, Salonen JT 2002 The metabolic syndrome and total and cardiovascular disease mortality in middle-aged men. *Jama* **288**(21):2709-16.
8. Malik S, Wong ND, Franklin SS, Kamath TV, L'Italien GJ, Pio JR, Williams GR 2004 Impact of the metabolic syndrome on mortality from coronary heart disease, cardiovascular disease, and all causes in United States adults. *Circulation* **110**(10):1245-50.
9. Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ 2005 The metabolic syndrome. *Lancet* **365**(9468):1415-28.
10. Lee NK, Sowa H, Hinoi E, Ferron M, Ahn JD, Confavreux C, Dacquin R, Mee PJ, McKee MD, Jung DY, Zhang Z, Kim JK, Mauvais-Jarvis F, Ducy P, Karsenty G 2007 Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton. *Cell* **130**(3):456-69.
11. Confavreux CB 2011 Bone: from a reservoir of minerals to a regulator of energy metabolism. *Kidney Int Suppl* (121):S14-9.
12. Fulzele K, Riddle RC, DiGirolamo DJ, Cao X, Wan C, Chen D, Faugere MC, Aja S, Hussain MA, Bruning JC, Clemens TL 2010 Insulin receptor signaling in osteoblasts regulates postnatal bone acquisition and body composition. *Cell* **142**(2):309-19.
13. Clemens TL, Karsenty G 2011 The osteoblast: an insulin target cell controlling glucose homeostasis. *J Bone Miner Res* **26**(4):677-80.
14. Bae SJ, Choe JW, Chung YE, Kim BJ, Lee SH, Kim HY, Koh JM, Kim HK, Kim GS 2011 The association between serum osteocalcin levels and metabolic syndrome in Koreans. *Osteoporos Int* **22**(11):2837-46.
15. Saleem U, Mosley TH, Jr., Kullo IJ 2010 Serum osteocalcin is associated with measures of insulin resistance, adipokine levels, and the presence of metabolic syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **30**(7):1474-8.
16. Tan A, Gao Y, Yang X, Zhang H, Qin X, Mo L, Peng T, Xia N, Mo Z 2011 Low serum osteocalcin level is a potential marker for metabolic syndrome: results from a Chinese male population survey. *Metabolism* **60**(8):1186-92.
17. Yeap BB, Chubb SA, Flicker L, McCaul KA, Ebeling PR, Beilby JP, Norman PE 2010 Reduced serum total osteocalcin is associated with metabolic syndrome in older men via waist circumference, hyperglycemia, and triglyceride levels. *Eur J Endocrinol* **163**(2):265-72.

18. Lehto S, Niskanen L, Suhonen M, Ronnema T, Laakso M 1996 Medial artery calcification. A neglected harbinger of cardiovascular complications in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **16**(8):978-83.
19. London GM, Guerin AP, Marchais SJ, Metivier F, Pannier B, Adda H 2003 Arterial media calcification in end-stage renal disease: impact on all-cause and cardiovascular mortality. *Nephrol Dial Transplant* **18**(9):1731-40.
20. Szulc P, Marchand F, Duboeuf F, Delmas PD 2000 Cross-sectional assessment of age-related bone loss in men: the MINOS study. *Bone* **26**(2):123-9.
21. Szulc P, Garnero P, Munoz F, Marchand F, Delmas PD 2001 Cross-sectional evaluation of bone metabolism in men. *J Bone Miner Res* **16**(9):1642-50.
22. Szulc P, Varennes A, Delmas PD, Goudable J, Chapurlat R 2010 Men with metabolic syndrome have lower bone mineral density but lower fracture risk--the MINOS study. *J Bone Miner Res* **25**(6):1446-54.
23. Kauppila LI, Polak JF, Cupples LA, Hannan MT, Kiel DP, Wilson PW 1997 New indices to classify location, severity and progression of calcific lesions in the abdominal aorta: a 25-year follow-up study. *Atherosclerosis* **132**(2):245-50.
24. Alberti KG, Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ, Cleeman JI, Donato KA, Fruchart JC, James WP, Loria CM, Smith SC, Jr. 2009 Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation* **120**(16):1640-5.
25. Hwang YC, Jeong IK, Ahn KJ, Chung HY 2009 The uncarboxylated form of osteocalcin is associated with improved glucose tolerance and enhanced beta-cell function in middle-aged male subjects. *Diabetes Metab Res Rev* **25**(8):768-72.
26. Iki M, Tamaki J, Fujita Y, Kouda K, Yura A, Kadowaki E, Sato Y, Moon JS, Tomioka K, Okamoto N, Kurumatani N 2011 Serum undercarboxylated osteocalcin levels are inversely associated with glycemic status and insulin resistance in an elderly Japanese male population: Fujiwara-kyo Osteoporosis Risk in Men (FORMEN) Study. *Osteoporos Int*.
27. Kanazawa I, Yamaguchi T, Tada Y, Yamauchi M, Yano S, Sugimoto T 2011 Serum osteocalcin level is positively associated with insulin sensitivity and secretion in patients with type 2 diabetes. *Bone* **48**(4):720-5.
28. Garcia-Martin A, Cortes-Berdonces M, Luque-Fernandez I, Rozas-Moreno P, Quesada-Charneco M, Munoz-Torres M 2010 Osteocalcin as a marker of metabolic risk in healthy postmenopausal women. *Menopause*.
29. Kanazawa I, Yamaguchi T, Yamamoto M, Yamauchi M, Kurioka S, Yano S, Sugimoto T 2009 Serum osteocalcin level is associated with glucose metabolism and atherosclerosis parameters in type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* **94**(1):45-9.
30. Kanazawa I, Yamaguchi T, Yamauchi M, Yamamoto M, Kurioka S, Yano S, Sugimoto T 2011 Serum undercarboxylated osteocalcin was inversely associated with plasma glucose level and fat mass in type 2 diabetes mellitus. *Osteoporos Int* **22**(1):187-94.
31. Kindblom JM, Ohlsson C, Ljunggren O, Karlsson MK, Tivesten A, Smith U, Mellstrom D 2009 Plasma osteocalcin is inversely related to fat mass and plasma glucose in elderly Swedish men. *J Bone Miner Res* **24**(5):785-91.
32. Confavreux CB, Borel O, Lee F, Vaz G, Guyard M, Fadat C, Carlier MC, Chapurlat R, Karsenty G 2011 Osteoid osteoma is an osteocalcinoma affecting glucose metabolism. *Osteoporos Int*.

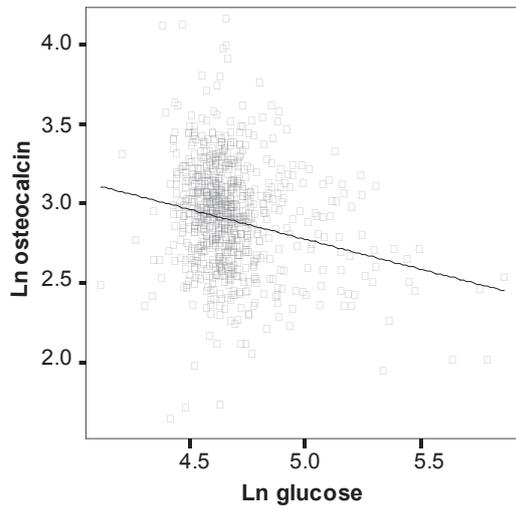
33. Holewijn S, den Heijer M, Swinkels DW, Stalenhoef AF, de Graaf J 2009 The metabolic syndrome and its traits as risk factors for subclinical atherosclerosis. *J Clin Endocrinol Metab* **94**(8):2893-9.
34. Parker BD, Bauer DC, Ensrud KE, Ix JH 2010 Association of osteocalcin and abdominal aortic calcification in older women: the study of osteoporotic fractures. *Calcif Tissue Int* **86**(3):185-91.
35. Oury F, Sumara G, Sumara O, Ferron M, Chang H, Smith CE, Hermo L, Suarez S, Roth BL, Ducy P, Karsenty G 2011 Endocrine regulation of male fertility by the skeleton. *Cell* **144**(5):796-809.
36. Awan Z, Alwaili K, Alshahrani A, Langsetmo L, Goltzman D, Genest J 2010 Calcium homeostasis and skeletal integrity in individuals with familial hypercholesterolemia and aortic calcification. *Clin Chem* **56**(10):1599-607.
37. Bacchetta J, Boutroy S, Guebre-Egziabher F, Juillard L, Draï J, Pelletier S, Richard M, Charrie A, Carlier MC, Chapurlat R, Laville M, Fouque D 2009 The relationship between adipokines, osteocalcin and bone quality in chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant* **24**(10):3120-5.
38. Luo XH, Zhao LL, Yuan LQ, Wang M, Xie H, Liao EY 2009 Development of arterial calcification in adiponectin-deficient mice: adiponectin regulates arterial calcification. *J Bone Miner Res* **24**(8):1461-8.

**Table 1: Baseline characteristics of the 798 men from the MINOS cohort.**

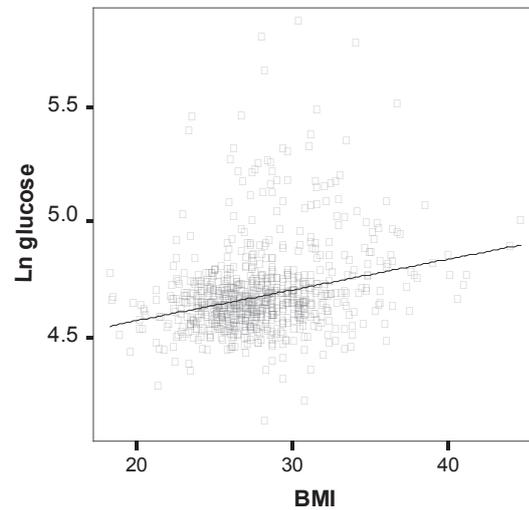
<b>Clinical parameters</b>	
Age (years)	65.3 ± 7.3
Weight (kg)	80.1 ± 12.7
Height (cm)	168.9 ± 6.3
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	28.0 ± 3.7
Ischemic heart disease	121 (15.2)
High blood pressure	197 (24.7)
Diabetes	58 (7.3)
Smoker	
current	91 (11.4)
former	447 (56.0)
never	254 (31.8)
Alcohol intake	
No	187 (23.4)
Occasional	209 (26.2)
< 3 IU/day	242 (30.3)
≥ 3 IU/day	159 (19.9)
Physical activity group	
< 10 hours/w	110 (13.3)
10 to 20 hours /w	276 (34.6)
20 to 30 hours /w	253 (31.7)
> 30 hours/w	158 (19.8)
Thiazide use	45 (5.6)
Vitamin K antagonist use	31 (3.9)
<b>Bone biology</b>	
Serum calcium (mg/L)	97 [94-100]
Serum phosphate (mg/L)	33 [30-36]
25 OHD (ng/mL)	27 [19-34]
PTH (pg/mL)	36 [28-48]
Albumin (mmol/L)	0.67 [0.64-0.71]
Serum creatinine (mg/L)	11 [10.1-12.2]
β-CTX (mmol/L)	2.194 [1.639-3.004]
BSAP (mIU/L)	15.7 [13.0-19.3]
P1NP (ng/mL)	32.4 [26.3-42.4]
Osteocalcin (ng/mL)	18.3 [14.6-22.4]
<b>Metabolic biology</b>	
Blood glucose (mg/dL)	103.4 [96.5-112.9]
Total cholesterol (mg/dL)	227.3 [203.5-254.6]
HDL-cholesterol (mg/dL)	48.0 [40.3-56.8]
Triglycerides (mg/dL)	148.5 [112.5-204.7]
<b>Sex biology</b>	
Total testosterone (nmol/L)	17.4 [12.8-21.5]
17β-estradiol (pmol/L)	110.1 [92.7-128.5]
SHBG (nmol/L)	75.6 [57.4-100.9]
<b>Abdominal aortic calcification score (AACS)</b>	<b>2 [0-6]</b>

Data are presented as mean ± SD, median [Q1-Q3] or n (%).

**Figure 1:**  
Linear correlation analysis between osteocalcin and blood glucose ( $r=-0.22$ ;  $p<0.001$ ) (left). Blood glucose was also correlated to body mass index ( $r=0.26$ ;  $p<0.001$ ) (right).



$\text{Ln osteocalcin} = 4.66 - 0.38 * \text{Ln glucose}$   
R-square = 0.05



$\text{Ln glucose} = 4.30 + 0.01 * \text{BMI}$   
R-square = 0.07

**Table 2: Bivariate comparison of osteocalcin in men with or without each diagnostic criteria of metabolic syndrome (MetS) according to the harmonized definition (24).**

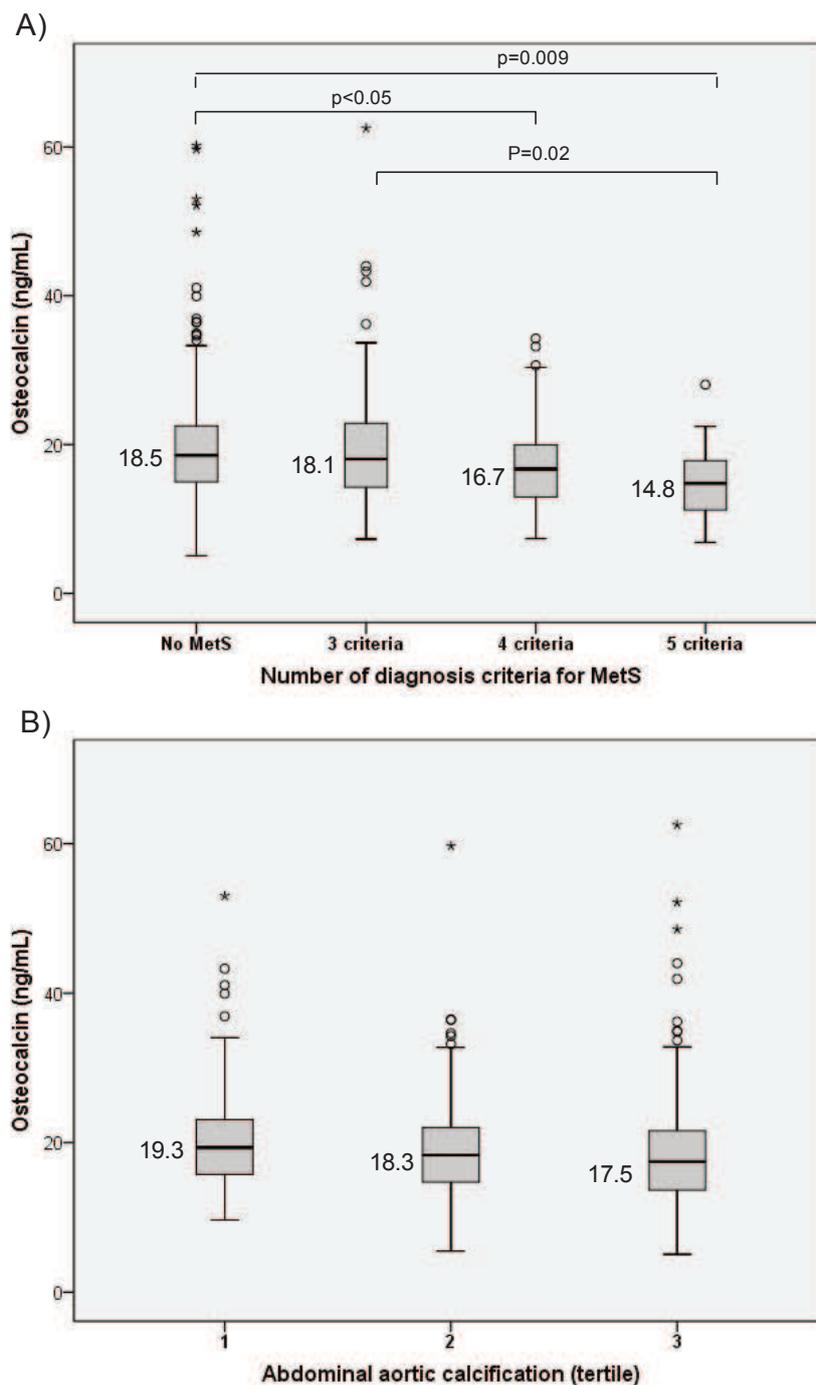
Parameter	Diagnostic criteria of metabolic syndrome		<i>p</i>
	Normal blood glucose	Elevated blood glucose ≥ 100 mg/dL	
Number of patients	494	283	
Osteocalcin (ng/mL)	19.0 [8.2]	17.9 [7.6]	0.002
	Normal blood pressure	Hypertension	
Number of patients	589	197	
Osteocalcin (ng/mL)	18.5 [7.6]	17.7 [8.1]	0.13
	Normal waist circumference	Elevated waist circumference ≥102 cm	
Number of patients	552	239	
Osteocalcin (ng/mL)	18.4 [7.6]	17.8 [8.2]	0.03
	Normal triglycerides	Elevated triglycerides ≥ 150 mg/dL	
Number of patients	396	381	
Osteocalcin (ng/mL)	18.5 [7.5]	17.9 [8.2]	0.07
	Normal HDL-cholesterol	Reduced HDL-cholesterol <40mg/dL	
Number of patients	586	191	
Osteocalcin (ng/mL)	18.4 [7.7]	17.9 [7.9]	0.23
	<b>Normal</b>	<b>Metabolic syndrome</b>	
Number of patients	551	247	
Osteocalcin (ng/mL)	18.5 [7.5]	17.4 [8.0]	0.01

Data are presented as median [IQ]. T-tests are performed using Log-transformed osteocalcin.

**Figure 2:**

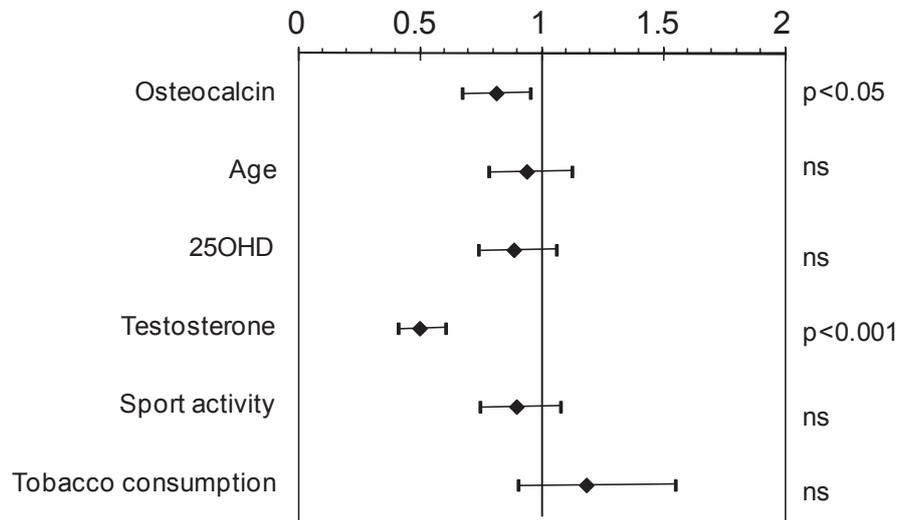
**2A) Association between serum osteocalcin levels and number of metabolic syndrome (MetS) traits: no MetS (n=551), 3 diagnosis criteria (n=155), 4 criteria (n=72) and 5 criteria (n=20). Global ANOVA test (for log-transformed osteocalcin) was  $p<0.001$ . Figure displays results of the post-hoc analysis between groups.**

**2B) Association between serum osteocalcin levels and tertiles of abdominal aortic calcification score (AACS),  $p<0.01$  after adjustment for age, smoking, physical activity, hypertension, vitamin K antagonist therapy, triglycerides, 25OHD, testosterone, and phosphorus.**



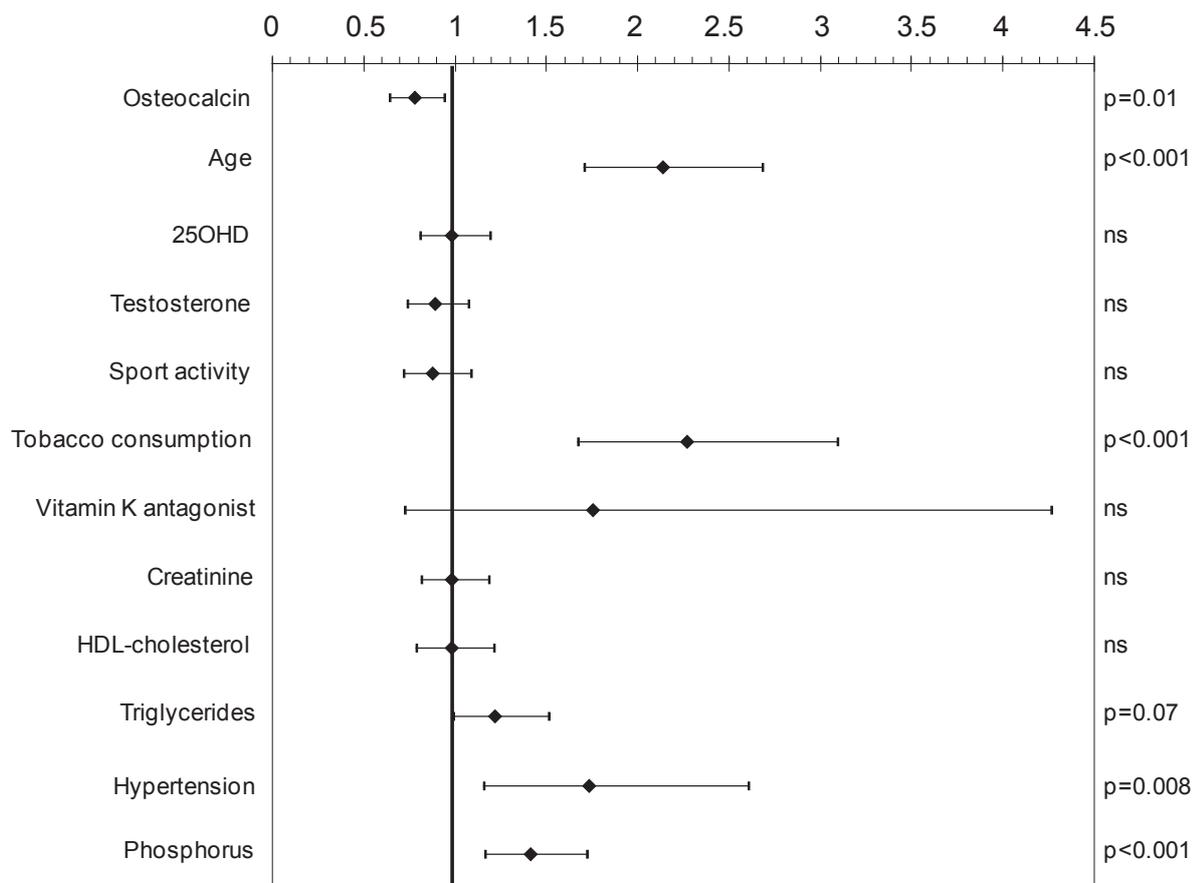
**Figure 3:**

**Association between metabolic syndrome and osteocalcin after adjustment for age, smoking, physical activity, 25OHD, and testosterone, in the logistic regression model. Osteocalcin and testosterone were associated to a reduced risk of metabolic syndrome (OR=0.82 per SD increase, 95%CI: 0.68-0.96; p=0.016) and (OR=0.50 per SD increase, 95%CI: 0.42-0.61; p<0.001), respectively.**



**Figure 4:**

**Association between elevated abdominal aortic calcification score (AACS>4 vs≤4 ) and osteocalcin after adjustment for age, 25OHD, testosterone, sport activity, smoking, vitamin K antagonist use, creatinine, HDL-cholesterol, triglycerides, hypertension and phosphorus in a logistic regression model. Osteocalcin was associated with a reduced risk of high calcification (OR=0.78 [0.64-0.94] per SD increase; p=0.01) whereas age (OR=2.14 [1.71-2.69] per SD increase; p<0.001), smoking (OR=2.27 [1.68-3.09]; p<0.001), hypertension (OR=1.73 [1.16-2.60]; p=0.008) and serum phosphorus (OR=1.42 [1.17-1.72] per SD increase; p<0.001) were associated with an increased risk of high calcification.**



## V- Perspectives

### 1) Limites de l'étude

Parmi les limites de ce travail, on retiendra qu'il s'agit d'une étude monocentrique qui a recruté une population assez homogène de sujets âgés masculins d'anciens mineurs de charbon. Nos résultats sont à vérifier dans d'autres populations. Le rôle du sexe est aussi à éclaircir. En effet le rôle de l'ostéocalcine est plus net chez les animaux mâles. C'est la raison pour laquelle nous avons souhaité faire ce premier travail dans l'étude MINOS composé uniquement d'hommes.

Notre étude est une étude transversale qui nous permet d'établir une association entre ostéocalcine et calcifications aortiques abdominales. En revanche, notre étude ne permet pas d'établir un lien de causalité entre les deux. Elle appelle la réalisation d'études longitudinales pour évaluer l'intérêt de l'ostéocalcine en tant que facteur de risque cardiovasculaire. De telles études devront préciser si l'on doit utiliser l'ostéocalcine en tant que variable continue ou plutôt définir une valeur seuil.

Nous avons bien conscience que les calcifications abdominales aortiques ne représentent qu'une partie des calcifications artérielles. La question des calcifications coronariennes n'a pu être abordée dans notre étude.

### 2) Mode d'action de l'ostéocalcine sur les calcifications artérielles

Le mécanisme par lequel l'ostéocalcine agit sur les calcifications vasculaires n'est pas établi. S'agit-il d'une action indirecte de l'ostéocalcine ? S'agit-il d'une action directe de l'ostéocalcine sur la paroi vasculaire et si c'est le cas, le processus de transdifférentiation cellulaire des cellules musculaires lisses de la média en cellules de type ostéoblastique exprimant l'ostéocalcine est-il impliqué ? De plus amples études chez l'animal sont nécessaires pour déchiffrer la relation entre ostéocalcine et calcifications artérielles.

Méthodologiquement, une des difficultés sera de choisir le bon modèle animal. En effet, spontanément, les souris, même en situation de régime hypercalorique riche en gras ne développent pas de calcification artérielle. Dès lors la plupart des expériences sont habituellement réalisées à partir de modèles murins capables de développer des calcifications artérielles : soit des souris déficientes en *apolipoprotéine E* (*ApoE*<sup>-/-</sup>) soit des souris déficientes en *LDL récepteur* (*LDLr*<sup>-/-</sup>). Un des points d'action prévisible de l'ostéocalcine sur le processus de calcification artérielle pourrait être la connexion entre ostéocalcine et insuline/insulinorésistance. Un autre pourrait être la vitamine K qui est transportée par l'apolipoprotéine E dans la circulation.

### 3) Sous groupe des patients diabétiques

A titre purement exploratoire, afin d'évaluer si l'ostéocalcine pourrait avoir une action indépendante de l'intolérance au glucose (insulinosécrétion / insulino-résistance), nous avons analysé le sous-groupe des 58 patients diabétiques présents dans l'étude (7.3%). Les résultats sont présentés ci-dessous.

Ils confirment que par rapport à la population globale, le diabète est un facteur de risque de calcifications artérielles important avec 58,6% des patients présentant des calcifications artérielles dans le 3<sup>ème</sup> tertile. L'ostéocalcine chez les patients diabétiques est plus basse que dans la population totale de l'étude. Tableau 2, figure 12.

La relation inverse avec ostéocalcine se retrouve : l'ostéocalcine est d'autant plus basse que les calcifications sont importantes. Dans un modèle de régression logistique multivariée, les tendances observées dans la population globale MINOS sont également retrouvées mais aucune des variables étudiées n'est significative (tabac, âge, ostéocalcine, phosphorémie, hypertension) sans doute du fait de l'effectif faible. Tableau 3.

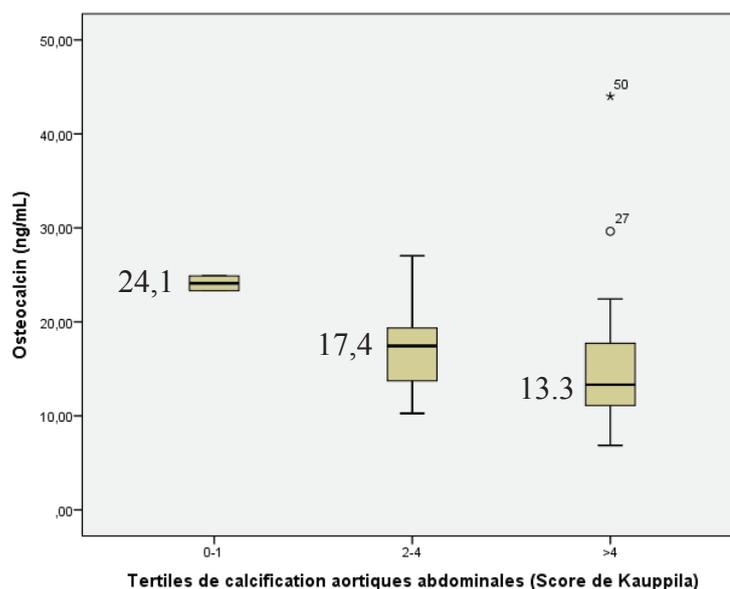
**Tableau 2** : caractéristiques du sous-groupe des 58 patients diabétiques en regard de la population globale de l'étude MINOS.

	798 hommes	58 hommes
<b>Critères cliniques</b>		
Age (années)	65.3 ± 7.3	67.0 ± 6.4
Indice de masse corporelle (kg/m <sup>2</sup> )	28.0 ± 3.7	29.8 ± 3.7
ATCD Infarctus du myocarde	121 (15.2%)	12 (20,7%)
HTA	197 (24.7%)	23 (39.7%)
Diabète	58 (7.3%)	58 (100%)
Tabagisme actif ou sevré	538 (67.4%)	45 (77.6%)
Traitement par AVK	31 (3.9%)	0 (0%)
<b>Biologie osseuse</b>		
Ostéocalcine (ng/mL)	18.3 [14.6-22.4]	14.7 [12,2-18,0]
Score de calcifications aortiques abdominales (SCAA)	2 [0-6]	6 [4-9]

moyenne ± SD, médiane [Q1-Q3] ou n (%).

**Figure 12** : mesures d'ostéocalcine dans le sous-groupe diabétique en fonction des tertiles de calcification de l'étude MINOS.

La répartition est inhomogène : premier tertile 2 patients (3.4%), 2<sup>ème</sup> tertile 19 patients (32.8%), 3<sup>ème</sup> tertile 34 patients (58.6%). La tendance globale intergroupe est significative en ANOVA ( $p=0.039$ ) mais il n'existe pas de différence significative en analyse post-hoc.



**Tableau 3** : analyse de régression logistique multivariée réalisée dans la population des patients diabétiques pour étudier l'association de chaque variable avec le seuil de calcification sévère (AACS>4) correspondant au 3<sup>ème</sup> tertile de la population globale utilisé dans l'analyse principale.

	p	OR	IC 95%	
			Inférieur	Supérieur
Ostéocalcine	,203	<b>,61</b>	,29	1,30
Age	,111	<b>2,19</b>	,83	5,75
Vitamine D	,614	1,24	,54	2,82
Testostérone	,246	,67	,35	1,31
Activité physique	,907	1,06	,40	2,78
Tabac	,226	<b>2,25</b>	,61	8,38
HTA	,381	<b>1,89</b>	,46	7,83
Créatininémie	,359	,75	,41	1,39
Triglycéridémie	,432	1,49	,55	3,99
HDL cholestérolémie	,998	1,00	,25	4,00
Phosphorémie	,407	<b>1,40</b>	,63	3,09

#### 4) Tertiles de calcifications aortiques spécifiques des diabétiques

Pour aller plus loin et tenter de s'affranchir encore un peu plus du diabète, nous avons redécoupé la population diabétique en tertiles sur la base des scores de calcifications observés chez ces patients diabétiques et non plus en utilisant le découpage en tertiles obtenu dans la population globale.

La nouvelle répartition des calcifications aortiques montre une sorte de seuil pour l'ostéocalcine qui est plus haut chez les patients avec peu de calcifications aortiques (premier tertile). Elle est ensuite similaire dans les deux autres tertiles, variant peu en fonction du degré de sévérité de ces calcifications. La tendance n'est pas significative ( $p=0.099$ ) entre les groupes. Figure 13.

On retrouve par ailleurs la relation inverse entre l'ostéocalcine et les calcifications artérielles avec un profil protecteur de l'ostéocalcine. Ainsi en comparant le premier tertile (faible calcification avec  $AACS \leq 4$ ) par rapport aux deux autres tertiles on observe une différence significative (t-test) ( $p=0.038$ ) entre les deux moyennes  $17.8 \pm 5$  ng/mL pour le groupe faible calcification versus les autres  $15.1 \pm 6.9$  ng/mL.

Dans un modèle de régression logistique multivarié, aucun des facteurs associés aux calcifications artérielles ne demeure significatif dans cette sous-population sans doute en grande partie en raison du faible effectif. Même si la significativité est perdue dans cette analyse les grandes directions observées dans l'analyse principale perdurent. Tableau 4.

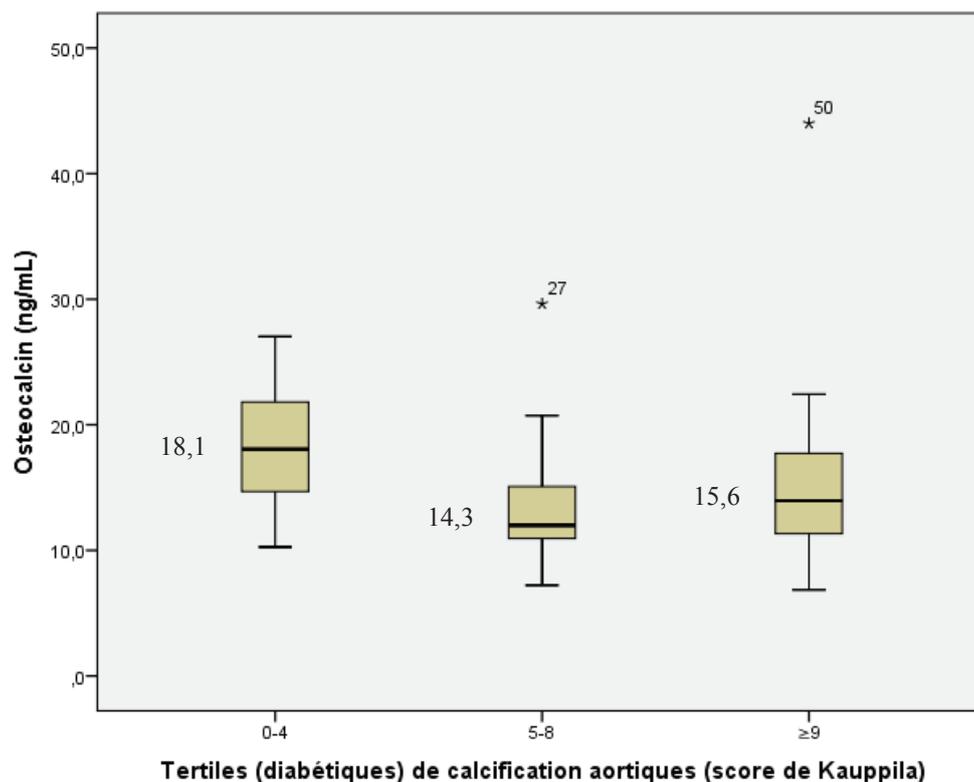
#### 5) Valeurs extrêmes et tertiles de calcifications

On note qu'il y a deux valeurs extrêmes : une dans le deuxième tertile ( $OC=29.75$  ng/mL) et une dans le troisième tertile ( $OC=44$  ng/mL). Nous avons exclu ces deux valeurs pour dégager une hypothèse plus précise. Dans ces conditions, l'analyse a donc été réalisée sur 56 patients. La tendance globale intergroupe devient significative en ANOVA ( $p=0.007$ ) et les tests entre 1<sup>er</sup> et 2<sup>ème</sup> tertile sont significatifs ( $p=0.016$ ) ainsi qu'entre le 1<sup>er</sup> et le 3<sup>ème</sup> tertile ( $p=0.046$ ). Figure 14.

La comparaison entre le tertile de faible calcification ( $AACS \leq 4$ ) avec les deux autres tertiles montre une différence en t-test nettement significative ( $p=0.002$ ) entre les deux moyennes  $17.8 \pm 5$  ng/mL pour le groupe faible calcification versus les autres  $13.7.1 \pm 3.9$  ng/mL.

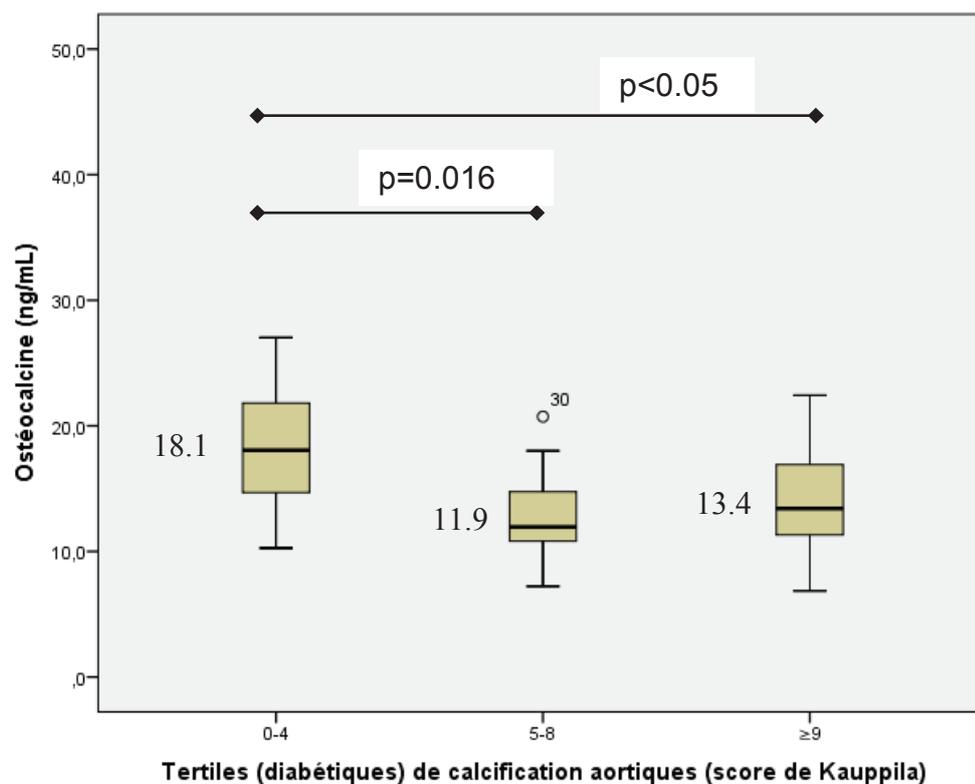
Lors de l'analyse de régression logistique multivariée, l'ostéocalcine apparaît là encore comme un facteur de protection vis-à-vis du risque de calcifications artérielles à la limite de la significativité ( $OR= 2.63 [0.98-7.04]$  ;  $p=0.054$ ). Tableau 5.

Cette analyse de sous-groupe est méthodologiquement fragile mais suggère que l'action de l'ostéocalcine sur les calcifications aortiques pourrait ne pas passer que par l'insulinosécrétion et l'insulinorésistance mais que l'ostéocalcine pourrait avoir un effet propre sur les calcifications vasculaires indépendamment de son action sur la glycémie et l'insulinorésistance. Ces résultats soutiennent la réalisation d'explorations chez l'animal à la recherche d'un éventuel rôle direct de l'ostéocalcine sur la paroi vasculaire.

**Figure 13** : population globale des diabétiques (n=58).**Tableau 4** : résultat du modèle de régression logistique multivarié pour l'association entre chaque variable et de faibles calcifications aortiques (CAAS≤4) chez les sujets diabétiques.

	p	OR	IC 95%	
			Inférieur	Supérieur
Ostéocalcine	,203	<b>1,63</b>	0,77	3,47
Age	,111	<b>0,46</b>	0,17	1,20
Vitamine D	,614	0,81	0,35	1,84
Testostérone	,246	1,48	0,76	2,90
Activité physique	,907	0,94	0,36	2,48
Tabac	,226	<b>0,44</b>	0,12	1,65
HTA	,381	0,53	0,13	2,19
Créatininémie	,359	1,33	0,72	2,46
Triglycéridémie	,432	0,67	0,25	1,81
HDL cholestérolémie	,998	1,00	0,25	3,99
Phosphorémie	,407	<b>0,71</b>	0,32	1,58

**Figure 14:** population des diabétiques moins les deux patients avec une ostéocalcinémie anormalement élevée.



**Tableau 5 :** résultat du modèle de régression logistique multivarié pour l'association entre chaque variable et de faibles calcifications aortiques (CAAS4) chez les sujets diabétiques (valeurs extrêmes enlevées).

	p	OR	IC 95%	
			Inférieur	Supérieur
Ostéocalcine	,054	<b>2,63</b>	0,98	7,04
Age	,455	<b>0,68</b>	0,25	1,87
Vitamine D	,741	0,87	0,38	1,99
Testostérone	,402	1,34	0,68	2,64
Activité physique	,870	0,92	0,35	2,42
Tabac	,363	<b>0,54</b>	0,14	2,06
HTA	,367	<b>0,51</b>	0,12	2,22
Créatininémie	,722	1,13	0,58	2,19
Triglycéridémie	,306	0,59	0,22	1,62
HDL cholestérolémie	,883	0,90	0,22	3,64
Phosphorémie	,546	<b>0,77</b>	0,34	1,78

## Partie III : Os et hormones sexuelles

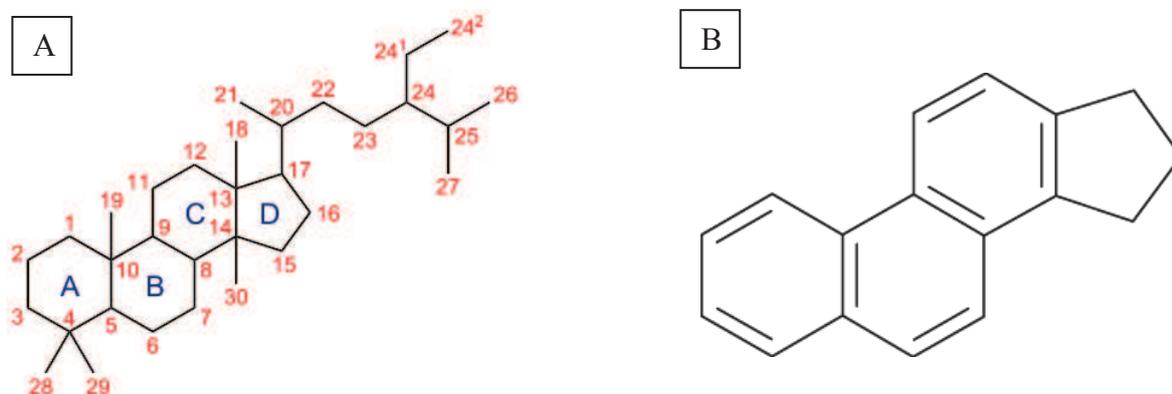
### A/ Introduction : les hormones sexuelles

#### I- La stéroïdogénèse

Toutes les hormones stéroïdiennes dérivent du cholestérol. Le cholestérol circulant se lie aux récepteurs lipoprotéiques des cellules stéroïdogéniques puis est internalisé. Son transport intracellulaire, vers le site de synthèse est réalisé par l'intermédiaire du cytosquelette et de protéines porteuses comme SCP-2 (Sterol Carrier Protein-2) où il subira plusieurs étapes de réduction par les enzymes du cytochrome P450 pour passer de 27 à 18 atomes de carbone. Figure 15.

Les stéroïdes sont des molécules lipidiques présentant un noyau cyclopentanophénanthrénique (stérane) hydrophobe à quatre cycles partiellement ou totalement hydrogéné. Figure 15. La plupart des enzymes impliquées dans la stéroïdogénèse sont des cytochromes P450 et des hydroxystéroïdes déshydrogénases (HSD). L'action des cytochromes P450 est irréversible.

**Figure 15** : nomenclature IUPAC des stéroïdes; en bleu, le lettrage des cycles, en rouge la numérotation des atomes du squelette des stéroïdes (A). Les 4 cycles de A à D forment un noyau appelé le cyclopentanophénanthrène (stérane) (B). D'après Wikipédia et IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN) <sup>171</sup>.



Les hormones stéroïdes ne sont pas stockées mais produites à la demande. La première étape est commune à toutes les cellules stéroïdogéniques : c'est la conversion du cholestérol en prégnénolone. Cette étape régule le taux de production finale. Plusieurs enzymes sont impliquées parmi lesquelles : le cytochrome P450<sub>scc</sub> (side chain clivage) qui est capable de cliver le cholestérol en prégnénolone, C21 précurseur de toutes les hormones stéroïdiennes actives. L'autre enzyme clé est StAR (Steroidogenic acute Regulatory protein). Figure 16. Chez l'homme, seuls six types cellulaires sont capables de réaliser ce clivage initial de conversion du cholestérol en prégnénolone :

- les cellules du cortex de la surrénale,
- les cellules de Leydig dans les testicules,
- les cellules de la thèque dans les ovaires,
- les cellules trophoblastiques du placenta,
- et certaines cellules gliales et neuronales.

Ensuite chaque type de cellules stéroïdogéniques exprime un répertoire particulier d'enzymes et de cofacteurs guidant la stéroïdogénèse vers la production d'une hormone prédominante. Ainsi dans la surrénale, la zone glomérulaire produit l'aldostérone, la zone fasciculée le cortisol et la zone réticulée la DHEA et la DHEAS. Figure 17. Les cellules de Leydig produisent la testostérone, les cellules de la thèque l'androstènedione qui sera converti en oestradiol par aromatisation et 17 $\beta$  HSD dans les cellules adjacentes de la granulosa après diffusion passive. Figure 18.

Les hormones stéroïdiennes sont regroupées en 5 grands groupes : la progestérone, les minéralocorticoïdes, les androgènes et les estrogènes.

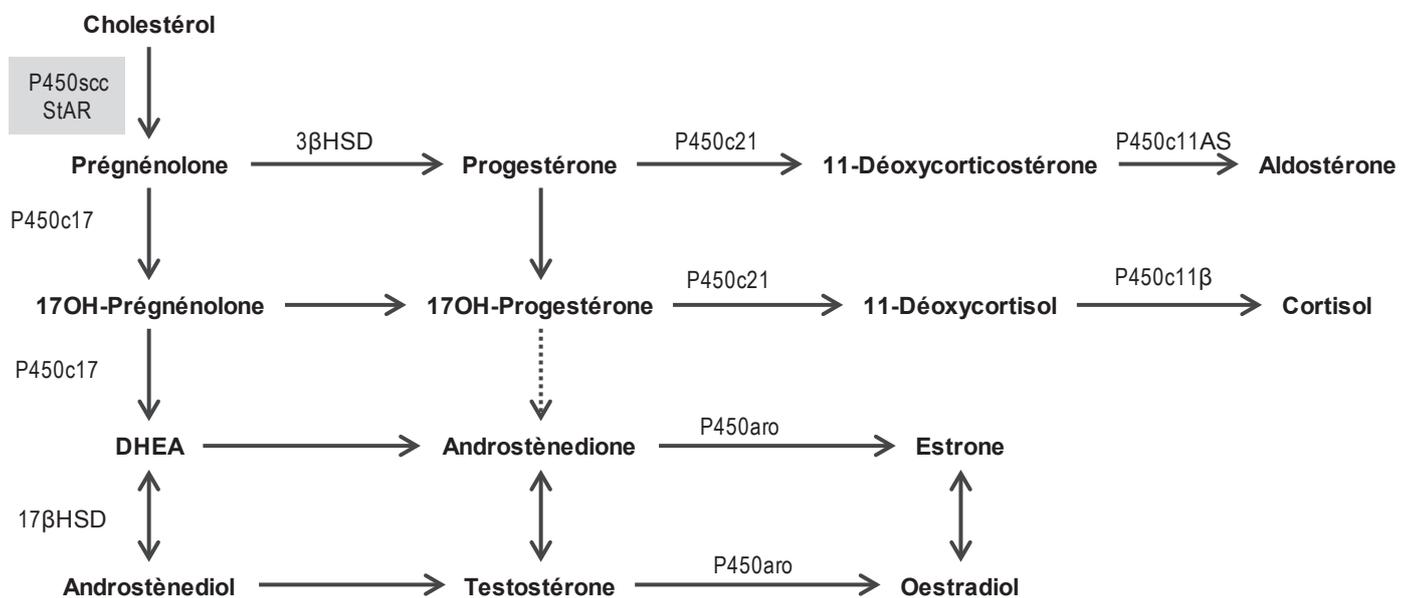
**Régulation continue de la stéroïdogénèse.** Chaque fois qu'un pic de sécrétion d'hormone corticotrope (ACTH) atteint la surrénale ou d'hormone gonadotrope (LH) atteint les gonades, un pic secondaire de production d'hormones stéroïdiennes est observé dans les minutes qui suivent. L'ACTH exerce une triple régulation sur la surrénale : elle stimule la croissance surrénalienne, elle agit sur l'expression d'enzymes stéroïdogéniques et permet l'entrée immédiate du cholestérol dans la mitochondrie où celui-ci devient un substrat de l'enzyme P450<sub>scc</sub> qui clive le cholestérol. Cette régulation de l'entrée du cholestérol par l'ACTH implique la localisation de StAR sur la membrane externe de la mitochondrie. Cette enzyme est déterminante comme en témoignent des modèles de souris knock-out pour *StAR* qui présentent une hypertrophie surrénalienne mais une très faible production d'hormones stéroïdes.

À côté de la régulation hypophysaire des hormones stéroïdiennes (LH, ACTH), il existe de multiples possibilités de régulation transcriptionnelle des enzymes impliquées dans la stéroïdogénèse, la localisation des protéines mitochondriales, le transfert électronique à partir de la NADPH mitochondriale. La régulation peut aussi s'exercer au niveau post traductionnel.

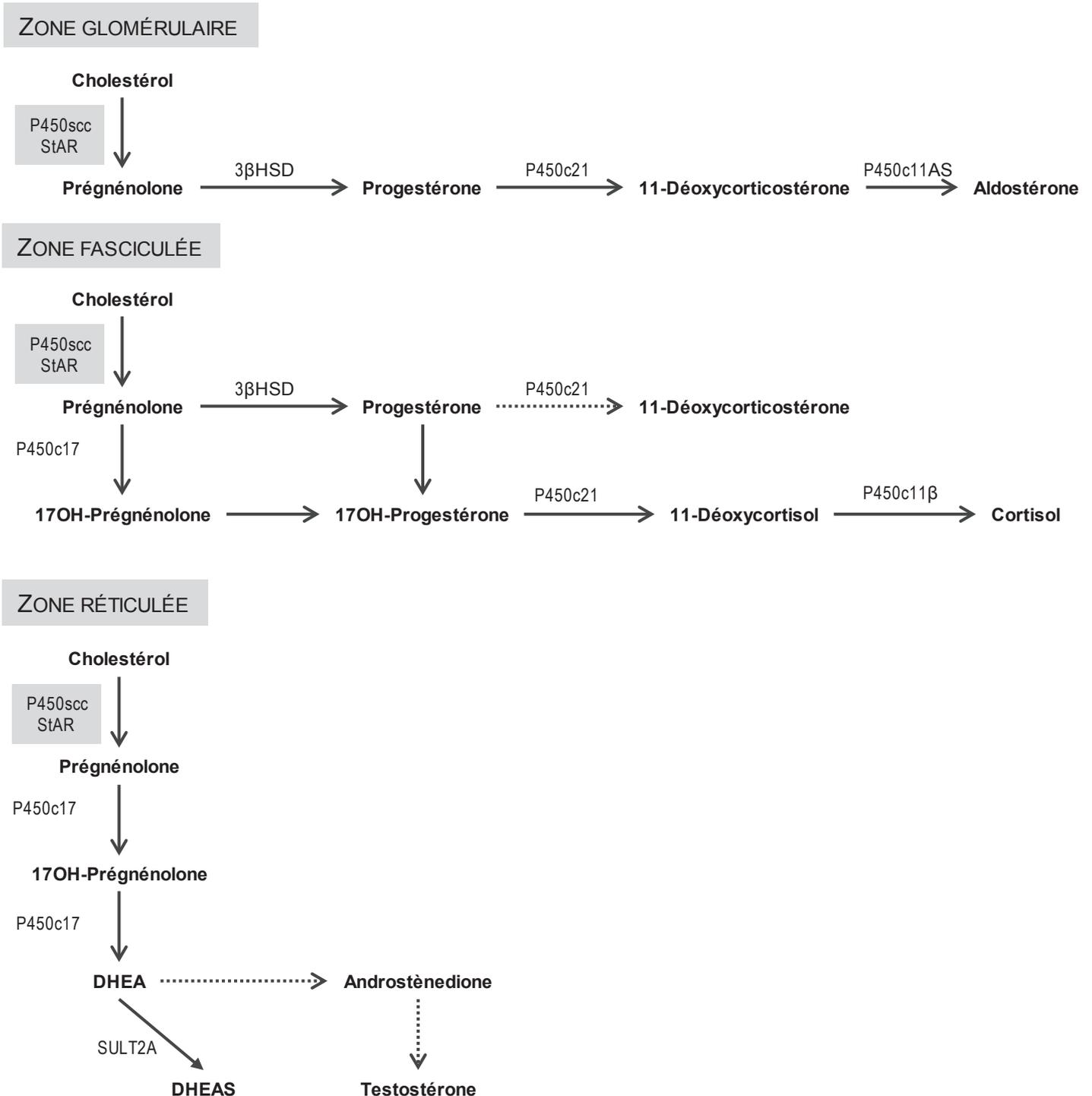
**Action des hormones stéroïdes.** Les hormones stéroïdes peuvent agir directement sur leurs tissus cibles. Dans un certain nombre de cas, une fois entrées dans le tissu cible, elles sont converties en un métabolite actif. C'est le cas par exemple de la testostérone convertie en 5 $\alpha$ -dihydrotestostérone (DHT) par la 5 $\alpha$ -réductase. Cette enzyme possède 2 isoformes : le type 2 dans les organes génitaux et la prostate ; le type 1 dans les organes non génitaux majoritairement la peau et le foie.

Il existe également un métabolisme périphérique des hormones stéroïdes. C'est le processus qui consiste à convertir les stéroïdes circulant en stéroïdes actifs dans les tissus non stéroïdogéniques à proprement parler. La peau, le foie et le tissu adipeux sont fortement impliqués dans cette transformation périphérique. Par exemple, 70 à 80 % de la testostérone circulante chez les femmes réglées provient de la conversion périphérique de la DHEA d'origine surrénalienne. À l'inverse les œstrogènes et les androgènes actifs sont inactivés dans l'utérus et certains tissus périphériques.

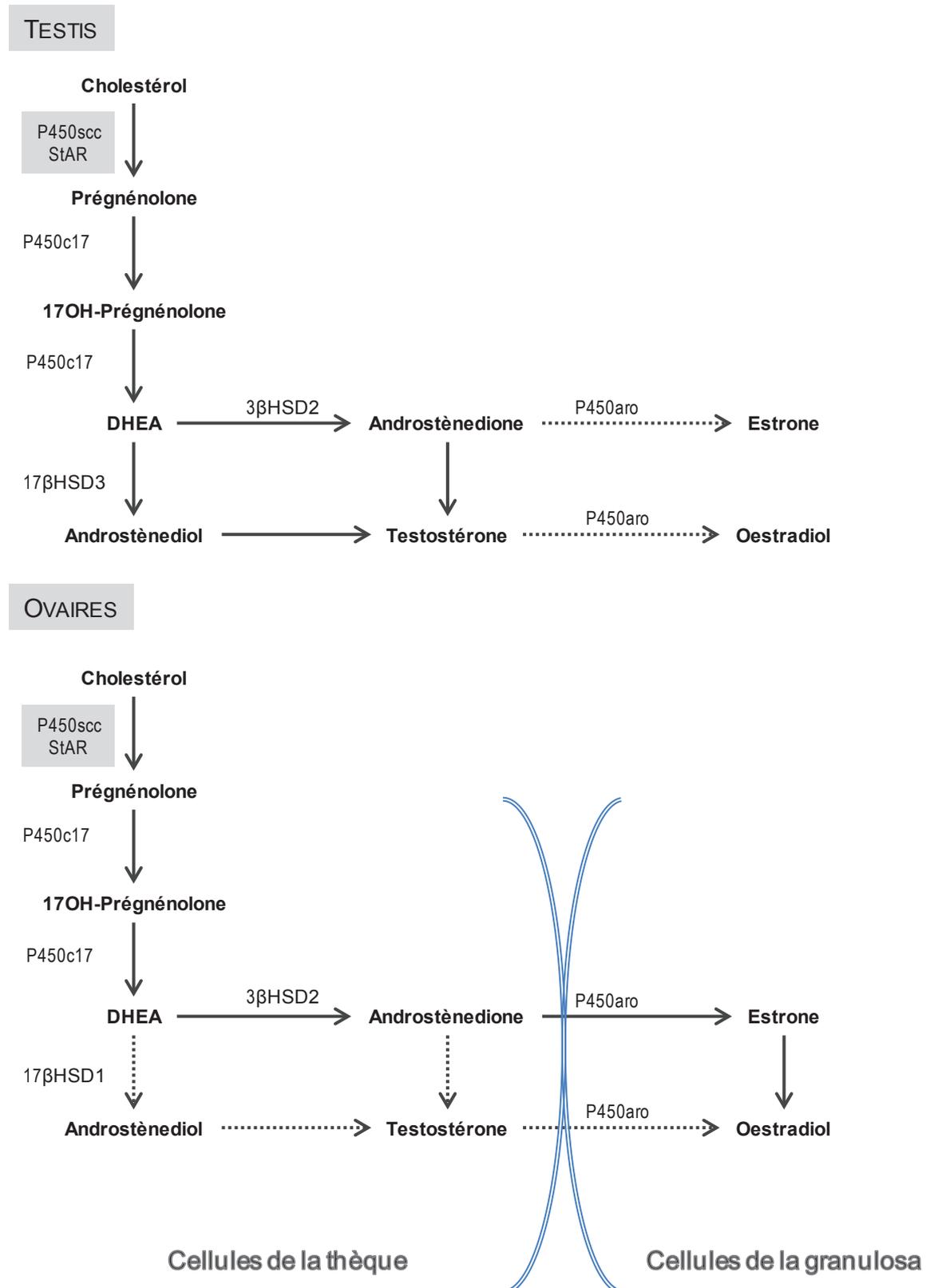
**Figure 16:** vue globale simplifiée des grandes voies de la stéroïdogénèse.  
Adapté de Jameson et De Groot <sup>172</sup>.



**Figure 17:** stéroïdogénèse dans les différentes zones de la corticosurrénale. Toutes les zones expriment StAR et P450scc qui permettent l'entrée du cholestérol dans la mitochondrie et son clivage en prégnénolone. L'expression différentielle des sous-types enzymatiques dans chaque zone oriente les transformations de la prégnénolone vers la formation de l'aldostérone dans la zone glomérulaire, le cortisol dans la fasciculée et la DHEA/DHEAS dans la réticulée. Adapté de Jameson et De Groot <sup>172</sup>.



**Figure 18:** stéroïdogénèse dans les gonades. Les cellules de Leydig (testicules) et les cellules de la thèque (ovaires) expriment StAR et P450scc qui permettent l'entrée du cholestérol dans la mitochondrie et son clivage en prégnénolone.  
Adapté de Jameson et De Groot<sup>172</sup>.



## II- Les oestrogènes

Les oestrogènes sont des hormones sexuelles stéroïdes<sup>8, 173, 174</sup>. Les oestrogènes naturels sont la 17 $\beta$ -oestradiol (E2), l'oestrone (E1) et l'oestriol (E3). Ce sont des stéroïdes à 18 atomes de carbone dérivés du cholestérol. Chez certaines plantes comme le soja ou le trèfle, il existe des molécules structurellement et fonctionnellement proches des oestrogènes que l'on nomme les phyto-oestrogènes.

### 1) Aromatisation

La dernière étape de la synthèse des œstrogènes (œstrone et œstradiol) est une aromatisation réalisée, à la face interne du réticulum endoplasmique lisse, par le complexe enzymatique P450 aromatasase mono-oxygénase à partir de l'androstènedione et de la testostérone. Figure 19. L'aromatase agit en association avec une flavoprotéine ubiquitaire, la NADPH réductase. Durant l'aromatisation, il y a transformation du noyau A des androgènes possédant une double liaison en 3-4, en une structure phénolique caractéristique des oestrogènes via trois oxydations successives : les deux premières sur le carbone 19 et la troisième clivant la liaison C10-C11 permettant ainsi la formation du noyau estrane à 18 atomes de carbone.

L'aromatase est une enzyme de la superfamille du cytochrome P450. Elle est produite à partir du gène CYP19 situé en 15q 1.2. Ce gène comporte 17 exons sur près de 80 kb mais dont la partie codante n'est formée que de 9 exons<sup>175</sup>. Pour l'heure, on connaît déjà 9 promoteurs différents qui régulent de façon tissu-spécifique la transcription de l'aromatase. Selon le tissu impliqué, c'est tel ou tel promoteur qui est activé sachant que chaque promoteur est sensible à des « signaux différents » (cytokines, hormones, facteurs de transcription)<sup>176</sup>. Par exemple, dans les ovaires, c'est le promoteur PII qui régule l'expression sous la dépendance de la FSH. A l'inverse dans le tissu adipeux, le promoteur utilisé est PI.4 qui est sensible à des cytokines (IL-6, IL11, TNF $\alpha$ ) et aux glucocorticoïdes.

### 2) Tissus sources

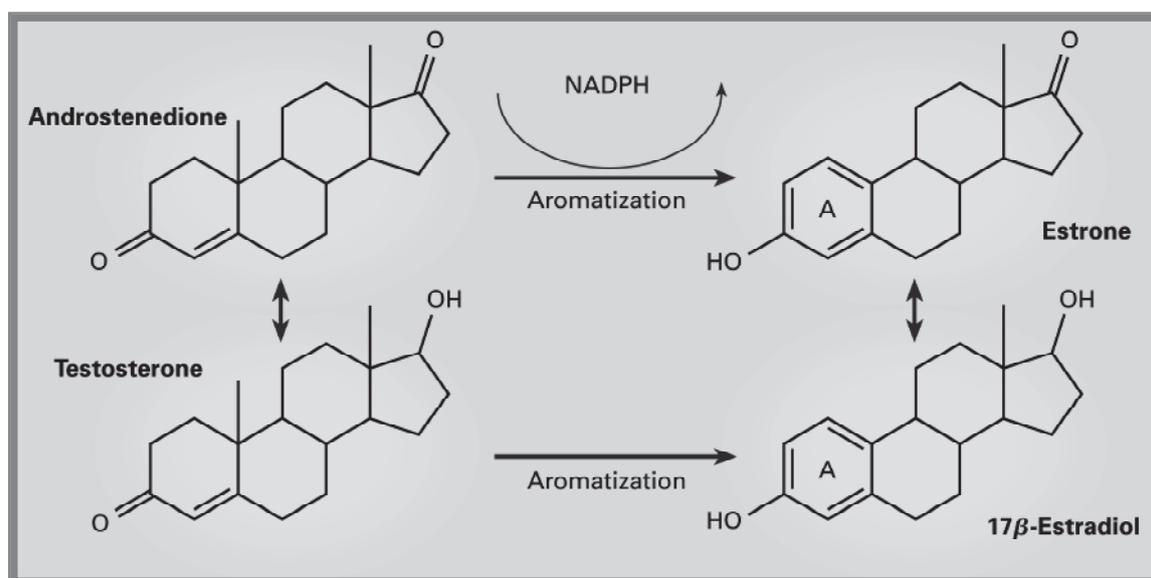
Les principales sources d'œstrogènes chez la femme non enceinte sont les cellules de la thèque et de la granulosa dans les ovaires et les cellules lutéales qui en dérivent. Globalement, la thèque sécrète les androgènes qui vont subir, dans la granulosa, l'aromatisation en œstradiol. L'œstrone (E1) et l'œstriol (E3) sont quant à elles synthétisées dans le foie à partir de l'œstradiol.

L'aromatase est également exprimée physiologiquement dans de nombreux autres tissus non glandulaires comme le tissu adipeux, le système nerveux, le foie, le muscle, l'os, les cellules mammaires, la prostate ou encore les cellules de Leydig dans les testicules. On parle de «*conversion périphérique*» des androgènes circulants en œstrogènes quand l'aromatisation n'est pas réalisée dans les ovaires.

Jusqu'à la ménopause, l'aromatase est très largement exprimée sous l'action de la FSH, hormone gonadotrope hypophysaire, dans les cellules granuleuses des

follicules ovariens qui sont la principale source d'œstrogènes en dehors de la grossesse (placenta). Après la ménopause, le taux d'œstrogènes circulant s'effondre de 400 pmol/l à environ 25 pmol/l et le taux résiduel d'œstrogènes résulte uniquement de la conversion périphérique d'origine non-ovarienne.

**Figure 19:** structure et synthèse terminale des œstrogènes (aromatization). D'après Gruber C. NEJM 2002 <sup>174</sup>.



### 3) Régulation de la synthèse des œstrogènes chez la femme

Durant la période d'activité génitale, la production d'œstrogènes est finement régulée par l'axe hypothalamo-hypophysaire. L'hypothalamus produit la GnRH qui stimule la sécrétion de LH et de FSH par les cellules antéhypophysaires. LH et FSH stimulent à leur tour la production ovarienne de stéroïdes sexuels : LH stimule la production de progestérone, prégnénolone, testostérone et androstènedione par les cellules de la thèque. FSH stimule la conversion périphérique par l'aromatase et la 17β-hydroxystéroïde déshydrogénase (17βHSD) d'androstènedione en œstradiol.

Les œstrogènes libérés dans la circulation exercent un rétrocontrôle négatif sur l'axe. La réponse génétique des cellules ovariennes à LH et FSH est modulée par des facteurs paracrins locaux comme les IGF.

Chez la femme, les androgènes sécrétés par les surrénales en réponse à l'ACTH et par les ovaires en réponse à la LH sont considérés comme des précurseurs de l'oestradiol et n'exercent pas de rétrocontrôle négatif sur l'hypophyse. Seul l'oestradiol et le cortisol exercent ce rétrocontrôle négatif sur l'hypophyse. En revanche, il existe des mécanismes de régulation paracrine et autocrine intraglandulaires.

La régulation de la « conversion périphérique » fait intervenir l'expression et l'activité in situ de l'aromatase, les 17β-hydroxystéroïdes déshydrogénases

(17 $\beta$ HSD) et les œstrones sulfatases. De plus, les gènes codant pour ces enzymes présentent des polymorphismes qui constituent une étape de régulation supplémentaire. Après la ménopause, les facteurs de régulation de la synthèse d'œstrogènes sont beaucoup moins bien démembrés.

#### **4) Dégradation**

Les œstrogènes sont métabolisés par sulfatation et glucoronidation. Leurs conjugués sont éliminés dans la bile et les urines. Au niveau intestinal, la flore peut hydrolyser ces conjugués et être source d'un cycle entéro-hépatique.

Une autre voie de dégradation possible est l'hydroxylation puis la méthylation pour former des dérivés catéchols et des dérivés méthoxylés. Les catéchols œstrogènes pourraient se lier faiblement aux récepteurs des œstrogènes. Quant aux dérivés méthoxylés, leur rôle dans la production de radicaux libres a fait évoquer des propriétés génotoxiques <sup>177</sup>.

### **III- La testostérone**

La testostérone est l'hormone sexuelle masculine. La testostérone est un androgène stéroïdien formé à partir du cholestérol. Elle est produite par les cellules de Leydig dans les testicules. Elle agit localement au niveau des tubes séminifères et de façon systémique une fois passée dans le sang. Les cellules de Leydig ne stockent pas de testostérone. En revanche elles accumulent de grandes quantités de cholestérol sous la forme de gouttelettes lipidiques prêtes à être transformées en testostérone.

#### **1) Action hormonale de la testostérone sur les tissus cibles**

La testostérone agit sur presque tous les tissus de l'organisme. Elle exerce des effets directs sur certains tissus comme le muscle, les reins et l'os en se liant à son récepteur. Dans les autres tissus, la testostérone est transformée par le tissu cible en un stéroïde secondaire actif dans la cellule : soit par aromatisation en œstradiol soit par transformation en un métabolite actif : la dihydrotestostérone (DHT) comme c'est le cas par exemple dans la peau, la prostate et les vésicules séminales. La DHT a une activité biologiquement plus importante que la testostérone avec une capacité de liaison plus importante et une capacité de dissociation plus faible que la testostérone sur le récepteur aux androgènes. Dans le cerveau, l'action de la testostérone est médiée par l'œstradiol suite à sa conversion périphérique par une aromatase in situ. Le reste de la testostérone circulante est dégradé par oxydation essentiellement hépatique avant d'être excrété par le rein dans les urines.

Au cours de la puberté chez les garçons (déclenchée par des doses élevées de GnRH), la testostérone induit la croissance des organes sexuels (penis, scrotum, testicule), le développement des caractères sexuels secondaires (pilosité, modification de la voix et du larynx, épaissement de la peau et sécrétion des glandes sébacées). C'est aussi la période d'augmentation de la masse musculaire et de la croissance des os longs (longueur et diamètre de section). Ces propriétés sur le muscle et les os font actuellement l'objet d'intenses recherches pour développer

des nouvelles thérapeutiques de type SARM (Selective Androgen Receptor Modulator) qui seraient utilisées dans le traitement de l'ostéoporose et de la sarcopénie. La testostérone a enfin une action sur la fertilité que nous détaillerons dans le chapitre suivant.

## **2) Le récepteur aux androgènes**

Le récepteur aux androgènes est un récepteur protéique nucléaire de 110 kDa. Son gène est situé sur le chromosome X en q11.2-q12 et comporte huit exons. Sa protéine est composée de trois domaines fonctionnels : un domaine N-terminal qui régule l'activité transcriptionnelle des gènes cibles, un domaine de liaison à l'ADN avec des motifs en doigts de zinc et un domaine de liaison aux stéroïdes. Les mutations du récepteur aux androgènes s'accompagnent d'une réduction de la masculinisation. En présence d'androgènes, le récepteur s'homodimérise et vient lier les promoteurs des gènes cibles par interaction avec des séquences d'ADN bien spécifiques appelées ARE (Androgen Response Element). En plus d'induire la masculinisation, le récepteur aux androgènes stimule la transcription du gène *AMHR* impliqué dans le processus de déféminisation, marqué notamment par l'involution du canal Müllérien entre la 9<sup>ème</sup> et la 11<sup>ème</sup> semaine de gestation.

## IV- Hormones sexuelles circulantes : la SHBG

### 1) Taux d'hormones sexuelles circulantes chez la femme

Les taux circulants d'œstradiol varient chez la femme au cours de la vie et du cycle menstruel. Tableau 6. Le taux est très variable suivant l'âge et le poids. Après la ménopause, le peu d'œstrogènes circulants est principalement de l'estrone (15-80 pg/ml) issu de la conversion périphérique de la testostérone.

Chez la femme réglée, dans les conditions normales, les ovaires et les surrénales contribuent à parts égales pour la production de testostérone totale circulante (20-70 ng/dL).

- La moitié de la testostérone totale provient d'une sécrétion directe des ovaires et des surrénales.
- L'autre moitié provient de la conversion périphérique dans la peau, le foie et le tissu adipeux de l'androstènedione produite par les ovaires et les surrénales.

Les taux plasmatiques de DHEAS (100-400µg/dL) reflètent la production d'androgènes surrénaliens. Le taux plasmatiques de 17-hydroxyprogestérone est comme l'androstènedione et la testostérone d'origine mixte.

**Tableau 6** : concentrations sériques d'œstradiol au cours de la vie chez une femme normale. D'après Gruber C.NEJM 2002 <sup>174</sup>.

	17β-estradiol (pg/ml)
Puberté	15-35
Phase folliculaire	40-200
Phase pré-ovulatoire	250-500
Phase Luteale	100-150
Phase pré-menstruelle	40-50
Après la ménopause	< 20

### 2) Formes circulantes libres et liées des hormones sexuelles

Plus de 96 % de la testostérone, de l'œstradiol et des autres 17β- hydroxystéroïdes présents dans le plasma circulent sous forme liée à des protéines porteuses. La fraction libre circulante est extrêmement faible (2 à 3 %) et constitue la forme active. La grande majorité est liée de façon réversible soit à une β-globuline (la Sex-Hormone-Binding-Globulin) soit à l'albumine avec une faible d'affinité.

Concernant les œstrogènes, il existe une troisième forme circulante : les esters lipidiques d'œstrogènes. Cette forme est plus difficile à cataboliser et joue sans doute un rôle non négligeable comme réserve de stéroïdes ainsi que dans la régulation des lipides (inhibition de l'oxydation des Low Density Lipoprotéines -LDL).

La Sex-Hormone-Binding-Globulin (SHBG) est produite par le foie et présente une forte affinité mais une faible capacité de liaison de la testostérone et de l'oestradiol <sup>178</sup>. La SHBG circule sous forme d'homodimère de 2 glycoprotéines chacune de 373 aminoacides avec trois sites de glycosylation et un seul domaine de liaison à forte affinité aux stéroïdes. La SHBG est très proche de la TABG (testicular androgen binding protein) sécrétée par les cellules de Sertoli dans les tubes séminifères. La SHBG est aussi produite par le placenta ce qui expliquerait le pic sérique observé durant la grossesse.

La SHBG joue un rôle fondamental pour la régulation de la fraction libre active de la testostérone et de l'oestradiol. Lorsque la concentration sérique de SHBG augmente, la fraction libre de testostérone diminue. Certaines conditions pathologiques modifient la concentration de SHBG. La production hépatique de SHBG augmente avec l'hyperthyroïdie, les hépatites aiguës ou chroniques (dont l'alcoolisme). À l'inverse, l'obésité est associée à une diminution de la SHBG. Des médicaments peuvent aussi modifier les taux circulants de SHBG <sup>179</sup>.

En conséquence, plus que la mesure de la testostérone totale circulante, il est important de mesurer la testostéronémie libre qui représente la forme active. Il est aussi possible de mesurer la testostérone biodisponible définie comme la testostérone non liée à la SHBG c'est-à-dire la somme de la forme libre et de la forme liée à l'albumine (faible affinité). Dans les cas d'hirsutisme avec obésité chez la femme, il n'est pas rare d'observer des taux de testostérone totale normaux alors que la testostérone libre est élevée suite à une baisse de la SHBG.

## **Préambule aux deux études suivantes**

**Nous présenterons ici successivement deux études concernant les relations entre l'os et les hormones sexuelles.**

**La première, classique, s'intéresse aux effets sur la masse osseuse d'une castration chimique par anti-aromatase réalisée chez des femmes ménopausées dans le cadre d'un traitement adjuvant d'un cancer du sein hormonodépendant.**

**La deuxième étude, au contraire, porte sur l'action de l'os sur la testostérone et la fertilité dans le cadre de notre travail sur l'ostéocalcine et le métabolisme énergétique.**

## B/ Effet d'une castration chimique par les anti-aromatases chez la femme ménopausée

### I- Régulation de la masse osseuse par les oestrogènes

#### 1) Rôle physiologique des œstrogènes

Les tissus cibles des œstrogènes sont répartis dans tout l'organisme. Les grandes fonctions des oestrogènes sont synthétisées dans le tableau 7 ci-dessous.

Concernant la glande mammaire, la densité des récepteurs aux œstrogènes varie selon la phase du cycle menstruel. La densité est maximale lors de la phase folliculaire. La glande mammaire est très sensible aux œstrogènes surtout au niveau des canaux galactophores distaux et des lobules. Ils stimulent la croissance et la différenciation de l'épithélium canalaire (action mitogène sur les cellules cylindriques) et stimulent la croissance du tissu conjonctif. Les œstrogènes jouent également un rôle pseudo-histaminolibérateur augmentant la microcirculation de la glande mammaire expliquant bien les problèmes de mastodynies avec les traitements hormonaux.

**Tableau 7:** action des œstrogènes sur les tissus cibles.

Tissus cibles	Action
Organes sexuels primaires	- Croissance, différenciation, hydratation. => Facteur de risque de cancer de l'endomètre.
Glande mammaire	- Croissance et prolifération. => Facteur de risque de cancer du sein.
Peau	- Limitation du vieillissement de la peau.
Cœur et vaisseaux	- Vasodilatation artérielle. - Cardioprotection.
Os	- Prévention de l'ostéoporose.
Foie	- Production de protéines (facteurs de coagulation, récepteurs hépatiques de lipoprotéines).
Système nerveux central	- Neuroprotection, modification de l'humeur.
Œil	- Baisse de pression intra-oculaire.
Tube digestif	- Réduction risque de cancer œsophagien.

## 2) Mécanismes d'action des œstrogènes

### Voie de signalisation classique.

Les hormones stéroïdiennes, petites molécules hydrophobes, diffusent directement à travers la membrane plasmique des cellules cibles et transmettent leur signal par l'intermédiaire d'un récepteur nucléaire spécifique : le récepteur aux œstrogènes (RE). Ce récepteur est une protéine qui appartient à la superfamille des récepteurs intra-cellulaires. Au repos, le RE est stabilisé dans une conformation inactive par une protéine chaperonne inhibitrice dont la localisation est essentiellement cytoplasmique. La liaison de la molécule d'œstrogène au RE entraîne le détachement de la protéine chaperonne, un changement de conformation du récepteur qui expose alors son site de liaison à l'ADN et sa migration dans le noyau. Cette migration ou translocation peut être influencée par l'interaction avec d'autres protéines cytosoliques comme la cavéoline-1.

Le RE agit sous forme dimérisée (homo- ou hétérodimères) en se liant à l'ADN par l'intermédiaire de ses deux motifs « doigts de zinc » au niveau de séquences consensus, appelées ERE (Estrogen Response Element). Le RE peut soit moduler directement la transcription de certains gènes soit moduler indirectement la transcription d'autres gènes en interagissant avec leurs facteurs de transcription comme AP-1 et NF-κB. Figure 20. Le message transmis, ou réponse transcriptionnelle finale, dépend de plusieurs facteurs :

- la structure du ligand (l'hormone),
- les caractéristiques du promoteur du gène cible et l'équilibre à ce moment précis entre les co-activateurs et les co-répresseurs,
- et le sous-type de récepteur (RE $\alpha$  et RE $\beta$ ) et ses isoformes.

Les deux sous-types de récepteurs sont bien distincts : le gène du RE $\alpha$  est porté par le chromosome 6 et celui du RE $\beta$  par le chromosome 14. Les récepteurs  $\alpha$  et  $\beta$  ne présentent que 55% d'homologie de séquence au sein de leur domaine de liaison à l'hormone expliquant les différences d'affinité observées pour une même molécule entre chacun d'eux. Par exemple, l'œstrone a une plus forte affinité pour le récepteur  $\alpha$ . Les récepteurs  $\alpha$  et  $\beta$  sont exprimés différemment au sein de chaque tissu cible. Tableau 8. Les sous-types de récepteurs permettent d'avoir des actions différentes : RE $\alpha$  est considéré comme un activateur alors que RE $\beta$  peut être inhibiteur du message transmis par les œstrogènes lorsqu'il forme un hétérodimère avec le RE $\alpha$  <sup>180</sup>.

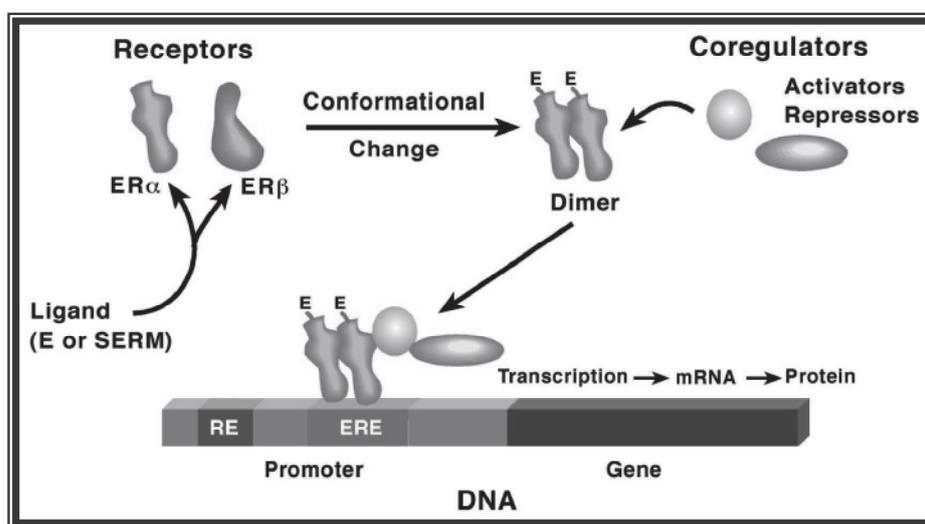
### Voies de signalisation alternatives (1) : activation du récepteur nucléaire des œstrogènes indépendamment de son ligand.

Le RE est une phosphoprotéine dont la phosphorylation de certaines sérines ou tyrosines spécifiques permet le passage d'une conformation de repos en forme active en l'absence de ligand. Une telle phosphorylation est catalysable par des enzymes d'autres voies de signalisation cellulaire comme le récepteur tyrosine kinase (TKR) ou des Mitogen-Activated Protein kinases (MAP kinases) <sup>181, 182</sup>. *In vitro*, de telles jonctions entre les voies de signalisation ont pu être mises en évidence avec l'analyse de marqueurs de l'activité œstrogénique en réponse à différents stimuli comme par exemple la dopamine, l'EGF, le TGF $\alpha$ , l'IGF1, l'AMP cyclique <sup>183, 184</sup>.

### Voies de signalisation alternatives (2) : actions non-nucléaires des œstrogènes.

L'augmentation de la synthèse protéique par activation transcriptionnelle est un phénomène long (plusieurs heures) qui ne peut expliquer des réponses extrêmement rapides aux œstrogènes comme par exemple la vasodilatation des artères coronaires<sup>185, 186</sup>. L'hypothèse actuelle est celle de la présence de récepteurs aux œstrogènes à la surface membranaire, couplés à une cascade de phosphorylation de MAP kinases. Ces actions non-nucléaires par l'intermédiaire de récepteurs de surface aux œstrogènes ont été démontrées dans divers types cellulaires : les ostéoblastes, les cellules endothéliales, les neurones et les cellules humaines de cancer du sein<sup>187</sup>.

**Figure 20** : principe de la transactivation génique par le récepteur des œstrogènes. D'après Osborne K. JCO 2000<sup>188</sup>.



**Tableau 8** : expression tissulaire différentielle des récepteurs aux œstrogènes.

<i>Tissus exprimant majoritairement</i> <i>RE <math>\alpha</math></i>	<i>Tissus exprimant majoritairement</i> <i>RE <math>\beta</math></i>
Endomètre, Stroma ovarien, Cellules de cancer du sein.	Cellules de la granulosa, spermatozoïdes, Os, Cellules endothéliales, Cerveau, Moelle osseuse, prostate, rein, parenchyme pulmonaire, muqueuse intestinale.

## II- Oestrogènes et traitement adjuvant du cancer du sein

### 1) Les cancers du sein

Les cancers du sein sont des tumeurs malignes épithéliales à différenciation glandulaire appelées adénocarcinomes. Le point de départ le plus fréquent (80%) est le canal galactophorique, on parle alors d'adénocarcinome canalaire. Plus rarement, la tumeur naît aux dépens de l'unité terminale ducto-lobulaire; on parle alors d'adénocarcinome lobulaire (10%). L'examen anatomo-pathologique est une étape fondamentale nécessaire dans la prise en charge des cancers du sein <sup>189</sup>. Cet examen permet de déterminer le type histologique et le grade histopronostique (habituellement Scarff Bloom Richardson -SBR- de I à III) de la tumeur. L'examen renseigne également sur l'extension des lésions tumorales, le pourcentage de carcinome canalaire in situ associé, l'existence d'emboles péri-tumoraux, les marges d'exérèse mais aussi le degré de prolifération cellulaire (index mitotique, expression de Ki67) et l'existence d'une surexpression de c-erb2.

### 2) Hormonosensibilité

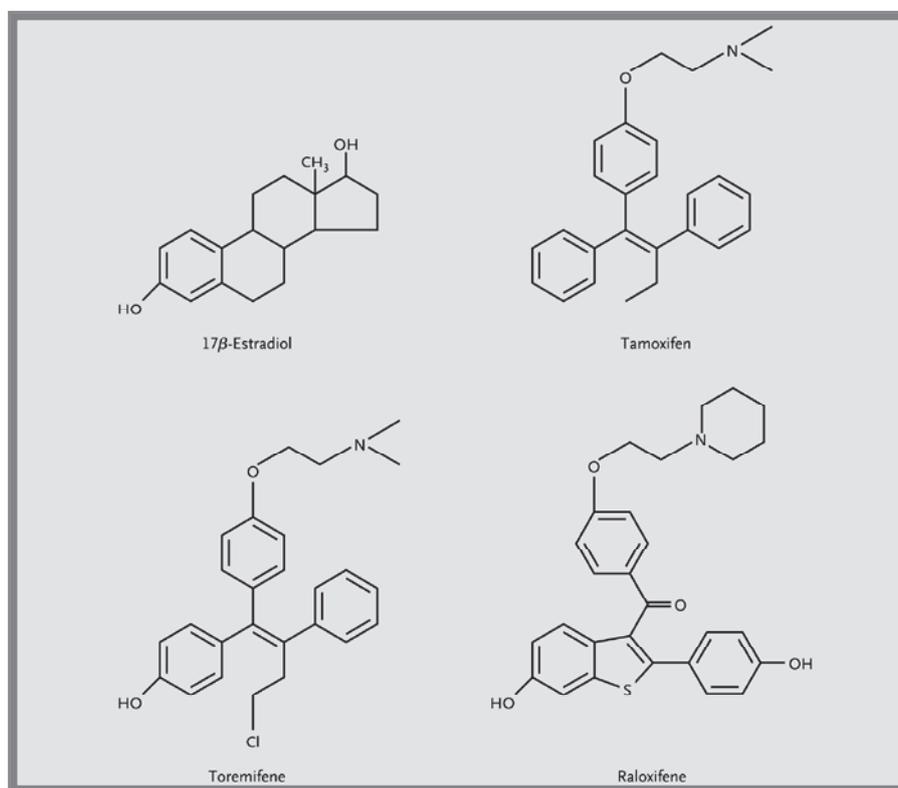
La glande mammaire est un tissu hormonosensible. Par conséquent, la croissance tumorale d'un cancer du sein, sous réserve qu'il soit hormonosensible, est stimulée par les œstrogènes. Il est donc primordial que l'examen histologique précise l'existence et le niveau d'expression des récepteurs hormonaux (progestérone, œstrogènes) de la tumeur. En plus des traitements classiques associant suivant les stades chirurgie, radiothérapie et chimiothérapie, l'hormonosensibilité des cancers du sein offre une arme supplémentaire pour la prise en charge. L'objectif est de bloquer l'activité des œstrogènes sur les cellules cancéreuses mammaires. Le bénéfice d'un tel traitement a été clairement démontré <sup>190, 191</sup>. Jusqu'à présent, devant toute tumeur mammaire exprimant le récepteur aux œstrogènes (RE) ou à la progestérone (RP), il était recommandé d'instaurer une hormonothérapie par tamoxifène pour une durée de 5 ans <sup>189, 192</sup>. Chez les femmes non-ménopausées, il est nécessaire en plus de réaliser un blocage complet réversible de l'axe hypothalamo-hypophysaire en utilisant un agoniste de LH-RH (goséreline, leuprolide, buséreline)

### 3) Les Selective Estrogen-Receptor Modulators (SERM)

Suite aux résultats de l'étude WHI qui a montré chez 16 608 femmes <sup>193</sup> que sous traitement hormonal substitutif, le risque fracturaire vertébral et le risque fracturaire fémoral étaient réduits de 34 % mais que les risques de cancer de l'endomètre, de cancer du sein et d'évènements thrombo-emboliques veineux étaient augmentés, l'intérêt pour les SERM n'a fait que grandir. Les SERM sont des molécules chimiques dont l'objectif est d'avoir des effets sélectifs agonistes ou antagonistes selon le tissu cible considéré à l'inverse des œstrogènes qui sont des agonistes stricts de leur récepteur ou des anti-œstrogènes qui sont des antagonistes uniformes. Figure 21. Les SERM ne présentent pas de structure stéroïdienne mais possèdent une structure chimique tertiaire leur permettant de se lier aux récepteurs des œstrogènes. L'effet recherché est le blocage de la prolifération de la glande mammaire et de l'endomètre tout en conservant les propriétés bénéfiques des œstrogènes (prévention de

l'ostéoporose et des pathologies cardio-vasculaires, action bénéfique sur la peau, le système nerveux central, le profil lipidique). Deux molécules sont disponibles en France. Le raloxifène a démontré son efficacité dans la réduction du risque fracturaire vertébral et a également une action positive en prévention primaire du cancer du sein hormono-dépendant<sup>194-198</sup>. Le tamoxifène est utilisé pendant 5 ans dans le cancer du sein hormonodépendant de la femme ménopausée et a montré son efficacité sur la survie globale et la survie sans récidence. Le tamoxifène a également un effet protecteur osseux modeste<sup>190, 191, 199</sup>. Le basedoxifène est présent dans d'autres pays que la France et le lasofoxifène pourrait arriver prochainement.

**Figure 21** : structure chimique du 17 $\beta$ -oestradiol et des trois SERM utilisés en clinique : le tamoxifène, le torémifène et le raloxifène. D'après Riggs. NEJM 2003<sup>200</sup>.



#### 4) Les anti-aromatases

Chez la femme ménopausée, la concentration locale d'œstradiol au niveau de la tumeur est élevée en dépit des taux circulants minimes. Ceci serait en lien avec une hyperactivité aromatasase in situ qui augmenterait localement la conversion périphérique<sup>201-204</sup>. Cette explication offre le rationnel de l'utilisation d'une hormonothérapie par anti-aromatase pour améliorer encore les résultats obtenus avec le tamoxifène. L'idée est d'effondrer simultanément le niveau des œstrogènes circulants et intratumoraux en bloquant la conversion œstrogénique intratumorale.

Les inhibiteurs de l'aromatase de troisième génération actuellement utilisés en clinique depuis le début des années 90, sont très spécifiques et n'ont plus d'effet sur la production endogène du cortisol ni de l'aldostérone. Avec un degré moyen d'inhibition de l'aromatase dépassant 98%, ils sont capables d'effondrer radicalement le taux circulant d'œstrogènes. Ceci représente une amélioration considérable de l'inhibition par rapport aux molécules de seconde génération (entre 50 et 90%)<sup>205, 206</sup>.

On distingue deux classes d'anti-aromatases (figure 22) :

- les *inhibiteurs de type 1* qui sont des analogues stéroïdiens de l'androstènedione. Ils se lient de façon irréversible à l'aromatase et sont appelés des inactivateurs enzymatiques. C'est la famille de l'exemestane-Aromasine®. Sa demi-vie est de 27 heures.

- et les *inhibiteurs de type 2* qui sont des inhibiteurs non-stéroïdiens se liant de façon réversible au groupement ferrique de l'aromatase par l'intermédiaire d'un atome d'azote. C'est la famille de l'anastrozole-Arimidex® et du letrozole-Femara® qui possèdent tous les deux un groupement triazolé pour la liaison. Leur demi-vie est voisine de 48 heures.

#### 5) Anti-aromatases et hormonothérapie adjuvante

Les anti-aromatases ont été évaluées en adjuvant dans le traitement du cancer du sein hormono-dépendant chez la femme ménopausée selon trois schémas différents.

Le premier schéma est un protocole de permutation pour une anti-aromatase après 2 ou 3 ans d'hormonothérapie par raloxifène. Ce schéma a été proposé pour profiter des effets bénéfiques du raloxifène sans allonger la durée du traitement qui augmente le risque de complications notamment thrombo-emboliques. Dans ce schéma, la durée totale d'hormonothérapie n'était pas modifiée et restait de 5 ans. Quatre études de phase III randomisées, en double aveugle et en intention de traiter ont posé cette question. L'étude IES réalisée avec l'exemestane contre le tamoxifène a inclus 4742 femmes<sup>207</sup> et a montré une réduction significative du risque de rechute (HR=0,68 [0,56-0,82]). Les études ABCSG-ARNO 95 réalisées avec l'arimidex versus le tamoxifène chez 3224 femmes ont été publiées conjointement dans le Lancet<sup>208</sup>. Elles montrent également un résultat significatif dès la première analyse à 28 mois de suivi avec un HR similaire de 0,6 [0,4-0,8]. Enfin l'étude italienne ITA toujours avec l'arimidex a randomisé 448 patientes suivies pendant 36 mois. Le nombre absolu d'événements est moindre (45 dans le groupe tamoxifène et 17 dans le groupe anastrozole) mais la différence entre les deux groupes est hautement significative (HR=0,35 [0,20-0,63] p<0,001)<sup>209</sup>.

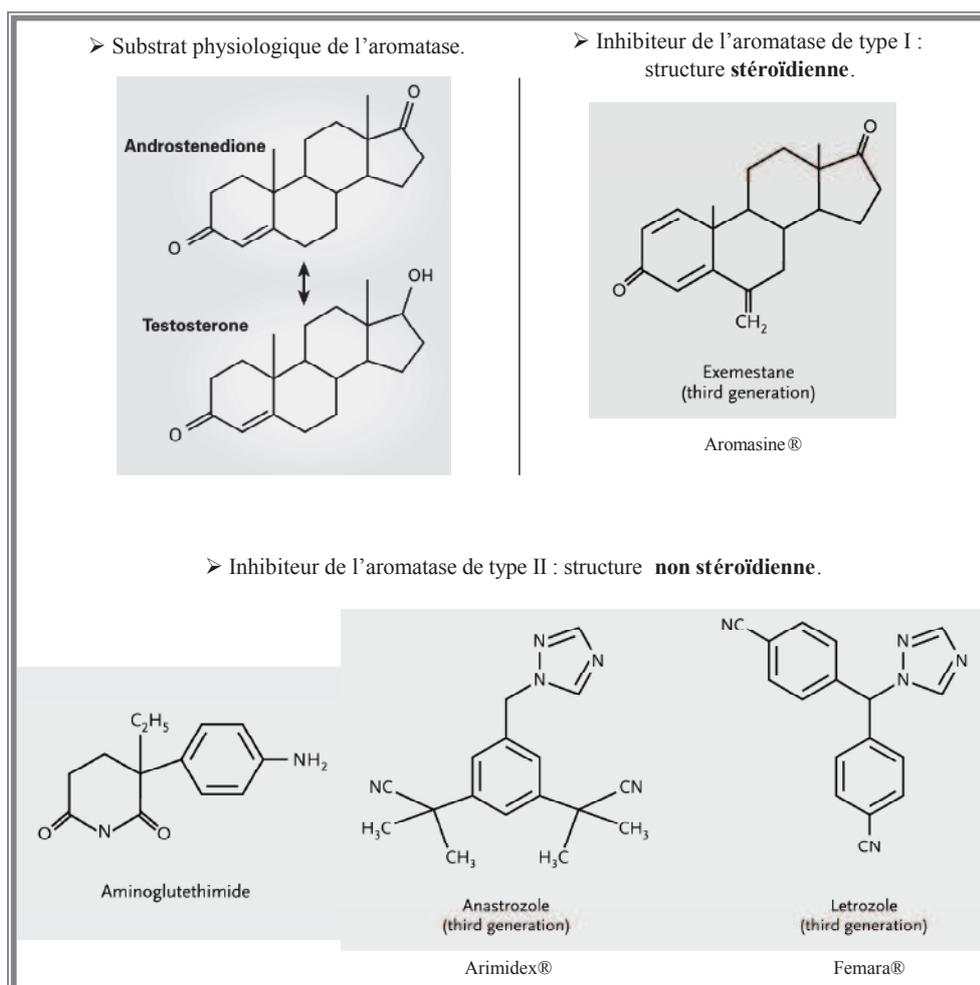
Le deuxième schéma d'hormonothérapie adjuvante proposé est de randomiser tamoxifène versus anti-aromatase pendant les 5 ans prévus de traitement anti-hormonal (étude ATAC). Les résultats ont été publiés initialement à 33 mois, puis à

47 et 68 mois<sup>210-212</sup>. Il existe un gain significatif de survie sans récurrence sous anti-aromatase par rapport au tamoxifène dès 33 mois (HR=0,83 [0,71-0,96]) p=0,007 et qui se prolonge lors des analyses ultérieures.

Le dernier schéma est celui d'un relais par anti-aromatase de type létrozole à la suite de l'hormonothérapie conventionnelle de 5 ans de tamoxifène. Ce dernier essai a randomisé 5187 femmes. Les résultats sont positifs en faveur du létrozole et sont concordants avec les études précédentes (HR=0,57 [0,43-0,75], p<0,001)<sup>213</sup>.

Ces études princeps ont fait passer les anti-aromatases, jusqu'alors réservées aux indications métastatiques, en première ligne de l'hormonothérapie adjuvante chez la femme ménopausée présentant un cancer du sein hormono-sensible pour la plupart des recommandations internationales à l'exception des recommandations anglaises NICE qui ont conservé le tamoxifène pour les patientes à bas risque pour des raisons économiques<sup>214-217</sup>. Le gain de délai sans rechute se chiffrerait ainsi avec l'anastrozole à 73% à 5 ans par rapport à un placebo, ce qui est en augmentation par rapport au traitement de référence par tamoxifène (47% à 5 ans)<sup>191, 212</sup>.

**Figure 22** : structure chimique de la testostérone, de l'androstènedione et des inhibiteurs de l'aromatase. D'après Smith NEJM 2003<sup>218</sup>.



### III- Hypothèse de travail

L'incidence des cancers du sein en France est de l'ordre de 85/100 000 ce qui correspond environ à 42 000 nouveaux cas par an<sup>219</sup> et signifie qu'en moyenne 1 femme sur 11 risque d'être confrontée à cette maladie. La grande majorité des tumeurs sont hormono-sensibles lors du diagnostic. Les campagnes de dépistage permettent le diagnostic le plus souvent au stade localisé et ces patientes ont donc un excellent pronostic à 5 ans. A la vue des résultats des études précédentes, la plupart de ces patientes relèvent donc d'une hormonothérapie adjuvante par anti-aromatase.

Les données de tolérance recueillies durant les études d'hormonothérapie adjuvante avec les anti-aromatases mettent clairement en évidence un profil différent de celui observé avec le tamoxifène. Schématiquement, le tamoxifène est responsable de significativement plus de maladies thromboemboliques veineuses (3,5%), d'accidents vasculaires cérébraux (2,1%), de métrorragies (8,2%) et d'adénocarcinomes secondaires de l'endomètre (0,2%)<sup>210</sup>. À l'inverse les patientes sous anti-aromatases présentent des bouffées de chaleur importantes et des troubles musculo-squelettiques. Par exemple, on relève dans l'étude ATAC 21,3% de troubles musculo-squelettiques avec l'anastrozole<sup>210</sup>.

Un autre effet secondaire soulevé par les études princeps est l'existence d'un risque osseux potentiellement lié aux traitements par anti-aromatases. Dans les études de permutation, on relève 7,4% d'ostéoporose avec l'exemestane vs 5,7% ( $p=0.023$ ) avec le tamoxifène<sup>207</sup> et un risque fracturaire global double avec l'anastrozole vs tamoxifène (2% vs 1%)<sup>208</sup>. Dans le schéma de l'étude ATAC, les 5 ans de traitement par l'anastrozole sont également responsables d'une augmentation du risque fracturaire (5,9% sous anastrozole vs 3,7% sous tamoxifène  $p<0.001$ )<sup>210</sup>. Dans l'étude MA17, le risque fracturaire n'est pas modifié<sup>213</sup>. La question du risque potentiel osseux des anti-aromatases représente un enjeu de santé publique étant donné l'excellent pronostic de ces patientes.

Comme rhumatologues impliqués dans la prise en charge de l'ostéoporose, nous avons été particulièrement alertés des risques osseux de cette nouvelle thérapeutique adjuvante diminuant drastiquement le taux d'œstradiol. En effet il est connu depuis 1987 qu'il existe une corrélation négative ( $r=-0.40$ ) entre le taux d'œstradiol et la perte osseuse densitométrique<sup>220</sup>. Plus tard, Stone dans l'étude SOF a montré qu'après ajustement, la perte osseuse à la hanche était non seulement associée à un taux d'œstradiol bas mais également à un taux élevé de SHBG ( $\geq 2.3 \mu\text{g/dL}$ )<sup>221</sup>. L'article princeps pour les fractures est une étude cas-contrôles de Cummings *et al.* en 1998 dans la SOF<sup>222</sup>. Les auteurs ont pris au hasard un groupe de 133 femmes ayant présenté une fracture du fémur et l'ont comparé avec un groupe contrôle de femmes sans antécédent fracturaire, appariées sur l'âge, issu de cette même cohorte. Ils ont également pris un second groupe de 138 femmes ayant présenté une fracture vertébrale à comparer avec le groupe contrôle. Le taux de recouvrement entre les deux groupes fracturés était de l'ordre de 10 %. L'âge moyen des patientes était de 65 ans. Un taux d'œstradiol effondré ( $<5\text{pg/mL}$ ) était associé à une augmentation du risque fracturaire de 2.5 à la hanche

[1.4-4.6] et au rachis [1.4-4.2]. De même une SHBG $\geq$ 1 $\mu$ g/dL était associée à une augmentation du risque fracturaire de 2.0 [1.1-3.9] à la hanche et 2.3 [1.2-4.4] au rachis. De façon remarquable, la combinaison d'un taux élevé de SHBG et d'œstradiol bas amplifiait massivement ce risque 6.9 [1.5-32] à la hanche et 7.9 [2.2-28] au rachis. Une augmentation comparable du risque fracturaire avec un taux d'œstradiol bas ou un taux de SHBG élevé a été retrouvé également dans les cohortes OFELY et Rotterdam dont l'âge moyen des patientes était similaire. La cohorte de Rotterdam retrouvait la combinaison œstradiol bas- SHBG élevée comme augmentant très significativement le risque fracturaire OR=7.8 [2.7-22.5]<sup>223, 224</sup>. Il semblerait que le risque pour ces deux facteurs diminue avec l'âge puisqu'il n'a pas été retrouvé dans la cohorte EPIDOS dont l'âge moyen de 81 ans est nettement plus élevé<sup>225</sup>. Certaines études montrent chez des femmes ménopausées sans antécédent fracturaire et sans traitement hormonal que seule une SHBG élevée reste associée à une augmentation du risque fracturaire dans un modèle incluant la testostérone, l'œstradiol et la SHBG<sup>226</sup>. Un des mécanismes évoqués comme participant à la fragilisation osseuse est l'augmentation de la résorption osseuse<sup>227</sup> mais cela n'a pas été retrouvé dans toutes les études<sup>228</sup>. L'implication de la SHBG<sup>229</sup> a aussi été mise en évidence dans l'ostéoporose masculine<sup>230</sup>. Dans cette étude, il existe une corrélation positive entre la SHBG et les CTX sériques ( $r=0.37$ ) et négative ( $r=-0.37$ ) avec la densitométrie à la hanche. Au niveau fracturaire, chaque augmentation de 1 écart type de la SHBG est associée à un OR de 2.04 [1.2-3.4].

Une des raisons, en dehors de la réduction de la fraction libre d'œstradiol circulant chez les patientes présentant une SHBG élevée, est vraisemblablement la réduction du taux libre circulant des androgènes d'origine ovarienne. L'importance physiologique après la ménopause de ces androgènes d'origine ovarienne, qui seront convertis secondairement par aromatisation périphérique, a été bien mise en évidence par Melton avec une incidence standardisée (SIR) du risque fracturaire de 1.54 [1.29-1.82] chez les femmes ayant subi une ovariectomie chirurgicale<sup>231</sup>.

Aussi bien chez l'homme que chez la femme, l'œstradiol biodisponible (c'est-à-dire non liée à la SHBG) semble jouer un rôle déterminant dans le maintien de la masse osseuse<sup>232-241</sup>. Par exemple des taux bas d'œstradiol biodisponible (<11 ou <14pg/mL) chez l'homme sont associés à une masse osseuse diminuée<sup>242, 243</sup> suggérant qu'il pourrait exister aussi chez l'homme un seuil d'œstradiolémie en dessous duquel la protection osseuse disparaît. Chez l'homme âgé la fraction circulante de l'œstradiol et de testostérone diminue de façon importante à cause d'une augmentation marquée de la SHBG ce qui contribuerait à la perte osseuse chez l'homme âgé<sup>242, 244</sup>. Comme nous l'avons vu, les androgènes agissent principalement chez l'homme et chez la femme ménopausée par le biais de la conversion périphérique en œstradiol. Il existe également une action directe des androgènes sur l'os qui a été déchiffrée grâce à la réalisation de modèles de souris déficientes en récepteurs aux androgènes (*ARKO*) et aux œstrogènes (*ERKO*)<sup>245-247</sup>. L'action des androgènes semble porter plutôt sur la microarchitecture au niveau des travées chez le mâle<sup>248</sup>. Ils ont aussi une action sur l'épaisseur corticale et l'apposition périostée contribuant à la puberté lors de la croissance à l'acquisition d'un squelette plus grand chez l'homme (taille en longueur et diamètre de section)<sup>238</sup>. L'œstradiol possède aussi une action corticale<sup>249</sup>.

Peu à peu, le concept émergent est celui que les taux physiologiquement bas après la ménopause de l'œstradiol (5-25 pg/mL) maintiennent quand même un remodelage acceptable et restent protecteur osseux par rapport à un taux effondré (<5pg/mL). Dans l'étude SOF, le décalage entre les moyennes de densitométrie des deux groupes était de 4,9 % à la hanche et 6,8 % au rachis<sup>250</sup>. Une autre façon de le mettre en évidence a été proposée par Heshmati *et al.* qui ont randomisé pendant 6 mois en double aveugle 42 femmes ménopausées depuis au moins 10 ans entre un placebo et une anti-aromatase (létrozole). A la fin de l'essai (6 mois), les patientes sous anti-aromatase présentaient une œstradiolémie indétectable et une augmentation de leur résorption osseuse<sup>251</sup>.

A la vue des résultats des études oncologiques et des études épidémiologiques dans le domaine de l'ostéoporose, nous avons décidé de mettre en place une étude prospective observationnelle d'un an du Suivi Osseux des Patientes traitées en Adjuvant par Anti-aromatase (SOPAA) en partenariat avec le Dr Jean-Paul Guastalla et le groupe sein du Centre Léon Bérard.

## IV- Résumé

Nous avons réalisé une étude prospective d'un an de l'évolution de la densité minérale osseuse et des marqueurs biochimiques osseux des femmes ménopausées présentant un cancer du sein hormonodépendant localisé et traitées par anti-aromatase en adjuvant (anastrozole). Les patientes non ostéoporotiques à l'inclusion ont été suivies et comparées à un groupe contrôle de 114 patientes appariées pour l'âge et issues de la cohorte OFELY<sup>252</sup>. Les patientes ostéoporotiques à l'inclusion ont reçu un traitement par risédronate hebdomadaire.

Cent dix huit femmes, dont l'âge moyen était de 60.5 ans, ont été incluses dans l'étude: 103 dans le groupe surveillance et 15 dans le groupe traité. Une des limites de ce travail est l'absence de dosage de la SHBG car ce dosage ne fait pas partie du bilan initial de l'ostéoporose reconnue par la caisse d'assurance-maladie, cadre de remboursement dans lequel s'effectuait notre étude.

### Trois conclusions principales ressortent de cette étude :

- l'hormonothérapie adjuvante par anti-aromatase est responsable dès la première année d'une perte de masse osseuse significative ( $p < 0.001$ ) aux deux sites ( $- 3.3 \pm 0.4\%$  en lombaire et  $-2.8 \pm 0.4\%$  à la hanche) associée à une accélération du remodelage ( $+36\%$  pour l'ostéocalcine et  $+34\%$  pour le CTX ;  $p < 0.001$ ).
- La perte osseuse est d'autant plus forte que la castration induite par l'anastrozole est intense définie comme une œstradiolémie indosable ou une baisse supérieure à 50% de la valeur à l'inclusion. En analyse multivariée, cette réponse anti-oestrogénique intense est associée à une augmentation du risque de forte perte osseuse ( $>5.6\%$  en lombaire et  $> 4.9\%$  à la hanche): OR de 10.4 [95% C.I. 1.9–57.2] ( $p=0.007$ ) et OR= 5.7 [1.3–25] ( $p=0.024$ ) respectivement en lombaire et en fémoral.
- La perte osseuse induite par l'anastrozole peut être prévenue par un traitement antirésorptif de type risédronate.

**V- Article** <sup>253</sup>

**Estrogen-dependent increase in bone turnover and bone loss in postmenopausal women with breast cancer treated with anastrozole. Prevention with bisphosphonates.**

**Confavreux CB**, Fontana A, Guastalla J-P, Munoz F, Brun J, Delmas P.D.  
Estrogen-dependent increase in bone turnover and bone loss in postmenopausal women with breast cancer treated with anastrozole. Prevention with bisphosphonates.

*Bone* 2007 Sep; 41(3): 346-52.



## Estrogen-dependent increase in bone turnover and bone loss in postmenopausal women with breast cancer treated with anastrozole. Prevention with bisphosphonates<sup>☆</sup>

C.B. Confavreux<sup>a,b</sup>, A. Fontana<sup>a,b</sup>, J.P. Guastalla<sup>c</sup>, F. Munoz<sup>a,b</sup>, J. Brun<sup>d</sup>, P.D. Delmas<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> INSERM Research Unit 831 and University of Lyon, Lyon, France

<sup>b</sup> Rheumatology Department, Hôpital Edouard Herriot, Lyon, France

<sup>c</sup> Léon Berard Regional Cancer Center, Lyon, France

<sup>d</sup> Nuclear Medical Center. Hôpital Cardio vasculaire et Pneumologique, Lyon, France

Received 27 November 2006; revised 14 May 2007; accepted 5 June 2007

Available online 16 June 2007

### Abstract

Aromatase inhibitors have demonstrated their superiority to tamoxifen as adjuvant therapy for early breast cancer in postmenopausal women, but are associated with an increased risk of fractures. The aim of our study was to analyze bone loss, bone turnover and their determinants in postmenopausal women treated with anastrozole.

We investigated bone loss and bone turnover markers (BTM) in a prospective open cohort study of 118 postmenopausal women treated with anastrozole for an early hormone-dependent breast cancer. Women without osteoporosis were not treated and compared with an age-matched control group of 114 healthy women. Osteoporotic patients ( $T$ -score  $\leq -2.5$  S.D.) received weekly risedronate. Bone mineral density (BMD), and the BTM serum osteocalcin and serum C-terminal cross linking telopeptide of type I collagen (CTX) and  $17\beta$ -estradiol were measured at baseline and 1 year later.

In the surveillance group, anastrozole induced after 1 year of treatment a marked bone loss at the spine (mean  $\pm$  S.E.M., [95% confidence interval])  $-3.3 \pm 0.4\%$  [ $-4.1$  to  $-2.5$ ]), and hip ( $2.8 \pm 0.4\%$  [ $-3.6$  to  $-2$ ]) that was significantly greater than in controls ( $p < 0.0001$ ). Anastrozole induced an increase in bone remodelling: osteocalcin ( $+36.6\%$ ,  $p < 0.0001$ ) and CTX ( $+34\%$ ,  $p < 0.0001$ ). In univariate models, a recent menopause, a low body mass index, a complete chemotherapy ( $\geq 6$  courses) and a marked antiestrogenic response – defined by a level of  $17\beta$ -estradiol  $\leq 2$  pg/ml at 1 year or a decrease  $> 50\%$  between baseline and 1 year – were associated with greater bone loss. In multivariate model, women in the highest quartile of bone loss at the spine ( $> 5.6\%$  at 1 year) and hip ( $> 4.9\%$ ) had a marked antiestrogenic response with OR of 10.4 [95% C.I. 1.9–57.2] ( $p = 0.007$ ) and 5.7 [1.3–25] ( $p = 0.024$ ) respectively. Among patients in the surveillance group, those with a normal  $T$ -score at both sites ( $n = 46$ ) had also a significant bone loss at spine  $-3.3 \pm 0.5\%$  [ $-4.3$  to  $-2.3$ ],  $p < 0.0001$  and at the hip  $-2.9 \pm 0.6\%$  [ $-4.1$  to  $-1.7$ ]  $p < 0.0001$ . In osteoporotic women treated simultaneously with anastrozole and risedronate, bone loss was prevented at hip, and increased at the spine ( $+4.1 \pm 0.9\%$  [2.3 to 5.9],  $p = 0.008$ ), and BTM decreased ( $-24\%$ ,  $-39\%$  for CTX,  $p = 0.003$  and  $0.001$  vs. changes in the untreated group).

Anastrozole increases bone turnover and induces an accelerated bone loss that is significantly related to the suppression of  $17\beta$ -estradiol production induced by aromatase inhibitor. The bisphosphonate risedronate prevents anastrozole induced bone loss.

© 2007 Elsevier Inc. All rights reserved.

**Keywords:** Anastrozole; Bone loss; Bone turnover marker;  $17\beta$ -Estradiol; Risedronate

<sup>☆</sup> C.B. Confavreux was supported by a one-year grant from the «Fondation pour la Recherche Médicale».

\* Corresponding author. Rheumatology Department, Pavillon F, Hôpital E. Herriot, 69437 Lyon cedex 03, France. Fax: +33 4 72 11 74 83.

E-mail addresses: [cyc.confavreux@free.fr](mailto:cyc.confavreux@free.fr) (C.B. Confavreux), [fontana@lyon.inserm.fr](mailto:fontana@lyon.inserm.fr) (A. Fontana), [guastalla@lyon.fnclcc.fr](mailto:guastalla@lyon.fnclcc.fr) (J.P. Guastalla), [munoz@lyon.inserm.fr](mailto:munoz@lyon.inserm.fr) (F. Munoz), [jocelyne.brun@chu-lyon.fr](mailto:jocelyne.brun@chu-lyon.fr) (J. Brun), [delmas@lyon.inserm.fr](mailto:delmas@lyon.inserm.fr) (P.D. Delmas).

8756-3282/\$ - see front matter © 2007 Elsevier Inc. All rights reserved.

doi:10.1016/j.bone.2007.06.004

### Introduction

Breast cancer is the most common cancer in women with an annual incidence of 85/100 000 in Caucasians [1]. A high proportion of these cancers express hormone (estrogen and/or progesterone) receptors, indicating that they are hormone-dependent. That hormone dependency offers a therapeutic target

which has been widely used and is still under investigation for new therapeutic strategies [2]. The selective hormone receptor modulator (SERM) tamoxifen inhibits estrogen activity in breast by competitively binding to estrogen receptor and is indicated as adjuvant endocrine therapy in postmenopausal women with early stage hormone receptor positive breast cancer [3,4]. Tamoxifen is associated with hot flashes, vaginal bleeding and some rare but serious adverse events such as endometrial cancer and thromboembolism [3]. Conversely, tamoxifen reduces bone loss in postmenopausal women [5].

A more recent endocrine therapy of breast cancer consists in reducing tissue and plasma estrogen levels by inhibiting peripheral conversion of androgens to estrogens with steroidal (exemestane) or nonsteroidal (letrozole and anastrozole) aromatase inhibitors. Third generation aromatase inhibitors are able to block aromatase activity with more than 97% efficiency [6,7]. Previously used as first line treatment for metastatic breast cancer [8,9], they have recently demonstrated their superiority to tamoxifen in various adjuvant endocrine therapy regimens for early stage hormone receptor positive postmenopausal breast cancers [10–17]. The ATAC study comparing anastrozole and tamoxifen showed at 3 years a benefit of anastrozole in disease free-survival (hazard ratio=0.79 [0.67–0.94],  $p=0.007$ ) with a reduction of 58% of contralateral breast cancer incidence [13]. Results were confirmed at 5 years [15]. Controlled trials have shown a distinct safety profile for aromatase inhibitors that are responsible for more arthralgia and fractures than tamoxifen. In the ATAC trial, after 68 months of follow-up, rates of arthralgia and fractures were significantly higher with anastrozole (respectively 35.6% and 11%) than with tamoxifen (29.4% and 7.7%) representing an increased relative risk of 1.32 (1.19–1.47) and 1.49 (1.25–1.77), respectively [15]. In the ABCSG-ARNO 95 study a relative risk of fracture of 2 was found in comparison to tamoxifen [11]. In the BIG study, after 25 months of follow-up [17], letrozole was responsible for significantly more fractures (5.7%) and arthralgia (20.3%) than tamoxifen (respectively, 4% and 12.3%). Because aromatase inhibitors are widely used in postmenopausal women with early breast cancer, there is a need to investigate specifically the effects of aromatase inhibitors on bone metabolism and bone loss. The aim of our study was to analyze bone loss, changes of bone turnover and their determinants, especially the role of  $17\beta$ -estradiol depletion, in a prospective cohort of postmenopausal women with early breast cancer before and after 1 year of anastrozole therapy compared to a control group of age matched healthy postmenopausal women.

## Materials and methods

*Patients included* were consecutive postmenopausal women, with hormone-dependent invasive early breast cancer. They were referred by oncologists of the Léon Berard Cancer Center (Lyon, France) after initial treatment including surgery, chemotherapy and radiotherapy. Thus metastatic patients were excluded and only disease-free patients before beginning endocrine therapy by anastrozole were included.

OFELY, a population-based prospective cohort, includes 671 healthy postmenopausal women already described elsewhere [18,19]. We extracted 114 women that were matched by age and body mass index with the anastrozole

patient group. They were followed concomitantly (2003–2005) and their bone mineral density (BMD) was measured on the same densitometer as patients with breast cancer. These 114 patients constituted a nonrandomized control group reflecting physiologic postmenopausal bone loss.

We excluded women that were not menopausal after initial treatment but we included women with chemotherapy induced menopause. Women with other active cancer, with bone disease such as Paget's disease, hyperthyroidism, hyperparathyroidism, Cushing's disease, osteomalacia and those taking bone specific treatment (bisphosphonate or raloxifene for more than 1 month, tamoxifen for more than 12 months) were excluded. The study was reviewed by the breast cancer physician committee and approved by the board of clinical studies of the Léon Berard Cancer Center. Furthermore, the local ethical committee (CCPPRB Lyon A) contacted prior to the study informed the investigators that the protocol was consistent with good clinical practice at that time (initiated at the end of 2003) and did not request a formal submission of the protocol for approval. Patients were clearly and fairly explained about the study. Since it was an observational prospective noninterventional study, no signed consent was performed. Independently of their breast cancer status, newly diagnosed osteoporotic women were treated with risedronate according to the standard practice guidelines for osteoporosis treatment.

## Bone assessment

At the screening visit, patients underwent a complete bone evaluation. Data concerning breast cancer, height, size, calcium intake according to Fardelone questionnaire [20] and clinical risk factors for osteoporosis including personal and family fracture history, menopausal age, hormone replacement therapy, physical activity, corticosteroids intake, tobacco and alcohol consumption were collected. BMD was measured by DXA with Hologic 4500 A and SL devices (Hologic, Waltham, MA, USA) at the spine and total hip ( $\text{g}/\text{cm}^2$ ) using NHANES database in calculating  $T$ -scores. The in vivo precision error of DXA, expressed as the coefficient of variation (CV), was 0.9% and 1% at the spine and hip; respectively. A control phantom was scanned every day and all DXA measurements were performed by same experienced team. Blood samples were collected fasting before 9:30 a.m. without tourniquet to prevent hemolysis. Bone biology included serum calcium, 25-hydroxyvitamin D level measured by radio-immunologic assay (Diasorin), bone resorption assessed by serum C-terminal cross linking telopeptide of type I collagen (CTX) using an automatic analyser (Elecys; Roche Diagnostic) with intra- and inter-assay CVs <3% and <8%, respectively. Bone formation was assessed with serum intact osteocalcin measured on Elecys (Roche Diagnostic). Serum CTX and osteocalcin are routinely used in France to assess bone remodelling in postmenopausal osteoporotic patients. Serum  $17\beta$ -estradiol was measured using an ultrasensitive radioimmunologic assay with a detection limit of 1.4 to 2 pg/ml and with intra- and inter-assay CVs at 18% at 4 pg/ml (ESTR-US-CT; CIS bio-international). Measurements were repeated after 1 year of anastrozole treatment.

## Treatment allocation

Patients presenting vitamin D deficiency, defined as a blood level below 12 ng/ml, received an oral vitamin D supplementation of 200 000 IU. Patients with a  $T$ -score above  $-2.5$  S.D. formed the surveillance group. Among them, patients with low calcium daily intake (<1500 mg/day) and osteopenia ( $-2.5 < T\text{-score} < -1$ ) received a daily oral calcium at 1000 mg plus vitamin D supplementation (800 IU of cholecalciferol-vitamin D). Patients with  $T\text{-score} \leq -2.5$  S.D., classified as osteoporotic patients formed the treatment group. They received weekly oral risedronate with the same daily oral calcium-vitamin D supplementation.

## Outcomes

The primary outcome was the change (%) in spine and hip BMD after 1 year of anastrozole treatment in the surveillance group. Secondary outcomes were 1 year change of bone turnover markers in the surveillance group, and the changes in BMD and bone turnover markers in the treatment group. We also analysed the effect of calcium-vitamin D supplementation on bone loss in the surveillance group.

### Statistical analysis

Data were recorded on Access® software (Microsoft). Data were analysed using Statistical Package for the Social Science version 11.0 (SPSS inc., Chicago, IL, USA). We made paired Wilcoxon tests to analyze changes between 0 and 1 year in each group and *U* Mann–Whitney test to compare differences between groups. Predictive factors for bone loss were studied by univariate analysis (Pearson chi-square) and multivariate model (linear logistic regression) and data are expressed as odds ratio (OR) with 95% confidence intervals.

### Results

Between December 2003 and November 2004, we included 118 consecutive patients in our open prospective protocol (Fig. 1). All patients included were treated by anastrozole for their adjuvant endocrine therapy. Eight patients (5 in surveillance group and 3 in treatment group) had been previously treated by tamoxifen for a mean duration of 5.6 months before switching to anastrozole and entering the study. Ten patients interrupted anastrozole because of severe arthralgia and myalgia and 7 were lost to follow-up. In the surveillance group, one-third (36/103) received daily calcium plus vitamin D oral supplementation. All patients with osteoporosis ( $n=15$ ) received risedronate 35 mg weekly and calcium and vitamin D supplementation.

### Baseline characteristics

Baseline characteristics of each group are in Table 1. No significant age difference (mean; range) was observed between groups: surveillance (60.5 years; 50–82), treatment (62 years; 50–82) and OFELY control group (60.6 years; 42–82). Median daily calcium intake was 766 [443] mg/day in surveillance group and 820 [613] mg/day in treatment group ( $p=0.990$ ). 16 patients in surveillance group presented with vitamin D deficiency (below 12 ng/ml) and 4 in treatment group ( $p=0.29$ ). 31% of patients in surveillance group and 27% in treatment group ( $p=0.115$ ) received hormone replacement therapy 4 years or more. All patients with breast cancer

underwent surgery, either tumorectomy or mastectomy. 77% (20/26) of patients in surveillance group treated by chemotherapy received at least 6 courses. There were 17 adjuvant chemotherapies and 9 neoadjuvant. Her2 was over expressed in 20% (9/44) of patients in surveillance group and 14% (1/7) in treatment group ( $p=0.927$ ). Two patients underwent breast cancer relapse. The first one presented an ipsilateral local relapse and had a second surgical procedure. Aromatase inhibitor was carried on. The second patient, considered as lost of follow-up, presented a diffuse metastatic relapse to liver, bones and lungs.

Two patients in each group had been on long-term corticotherapy. 13% of patients were previously treated by daily oral calcium plus vitamin D supplementation: 11 in surveillance group and 2 in treatment group. One patient having lumbar *T*-score below  $-2.5$  S.D. refused bisphosphonate therapy and thus was allocated to the surveillance group. As expected, bone turnover markers tended to be higher at baseline in the osteoporotic group than in the surveillance group.

### BMD changes

In the surveillance group we observed a significant bone loss after 1 year of treatment by anastrozole. Spine bone loss (mean±S.E.M., [95% confidence interval]) was  $-3.3\pm 0.4\%$  [ $-4.1$  to  $-2.5$ ], and hip bone loss was  $-2.8\pm 0.4\%$  [ $-3.6$  to  $-2$ ] ( $p<0.0001$ ) (Fig. 2). Among patients in the surveillance group, those with a normal *T*-score at both sites ( $n=46$ ) also had a significant bone loss at the spine  $-3.3\pm 0.5\%$  [ $-4.3$  to  $-2.3$ ] and at the hip  $-2.9\pm 0.6\%$  [ $-4.1$  to  $-1.7$ ],  $p<0.0001$  for both.

### Bone turnover markers

Anastrozole induced a significant 36.6% and 34.2% mean increase in serum osteocalcin and CTX, respectively, at 1 year in comparison to baseline (Fig. 3).

### Estradiol measurements

Estradiol measurements at baseline and 1 year were available for 57 patients. The median was 4.6 pg/ml at baseline and 1.4 pg/ml after 1 year of anastrozole ( $p=0.035$ ). The median decrease was  $-53\%$  (Fig. 4).

### Calcium–vitamin D supplementation in surveillance group

Among the 103 patients enrolled in surveillance group, 36 patients received a calcium–vitamin D supplementation and 67 did not. 86% and 88%, respectively, completed the study. Median baseline BMD was significantly lower ( $p<0.0001$ ) in the calcium–vitamin D supplementation subgroup than in the untreated one at the lumbar spine ( $0.864$  vs.  $0.994$  g/cm<sup>2</sup>) and at the hip ( $0.816$  vs.  $0.888$  g/cm<sup>2</sup>). After 1 year, 25 OH vitamin D level increased significantly more in the supplementation subgroup ( $+9$  vs.  $+2$  ng/ml;  $p=0.001$ ). However, BMD and BTM changes were not modified by supplementation (data not shown).

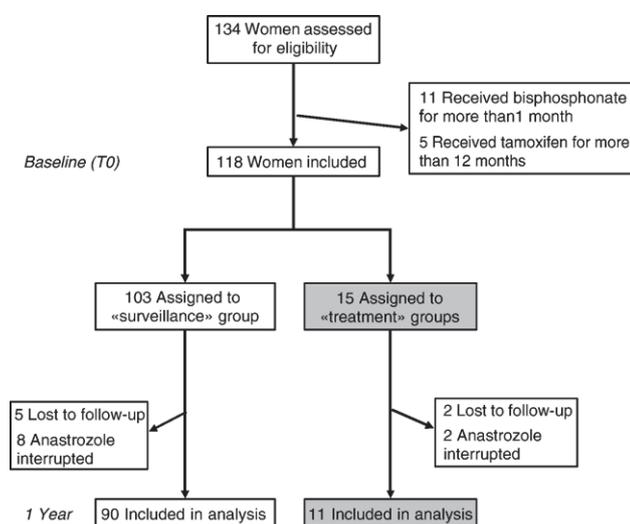


Fig. 1. Enrollment, assignment, follow-up and analysis.

Table 1

Osteoporotic risk factors, bone mass, bone parameters and tumoral characteristics at baseline in surveillance ( $n=103$ ), risedronate treatment group ( $n=15$ ) and OFELY controls ( $n=114$ )

Variable		“Surveillance group” ( $n=103$ )	“Treatment group” ( $n=15$ )	<i>P</i> value
Lumbar	BMD T0 (g/cm <sup>2</sup> )	0.964±0.097/0.940 [0.193]	0.741±0.1/0.725 [0.139]	<0.0001
	<i>T</i> -score T0 (DS)	−0.46±1.23/−0.73 [1.77]	−2.42±0.83/−2.6 [1.1]	<0.0001
	Osteopenia	40 (39%)	5 (33%)	
Femoral	BMD T0 (g/cm <sup>2</sup> )	0.877±0.1/0.869 [0.136]	0.705±0.088/0.681 [0.180]	<0.0001
	<i>T</i> -score T0 (DS)	−0.48±0.95/−0.53 [1.38]	−2.11±0.85/−2.34 [1.73]	<0.0001
	Osteopenia	31 (30%)	6 (40%)	
Age (years)		60.5 [9.3]	57.8 [15.2]	0.824
BMI (kg/m <sup>2</sup> )		24.1 [7.1]	21.4 [4]	0.011
Size (m)		1.61 [0.09]	1.60 [0.04]	0.753
Weight (kg)		64.5 [14.2]	55 [14]	0.004
Menopausal				
Age (years)		50 [5]	50 [5]	0.835
Early menopausal (<45 years)		17 (16%)	1 (7%)	0.331
Menopausal delay (years)		8.8 [10.6]	9.8 [17.7]	0.538
Family osteoporosis history		21 (20%)	7 (47%)	0.021
Personal fracture history (yes)		19 (18.4%)	7 (47%)	0.014
– Wrist		8 (8%)	2 (13%)	
– Vertebrae		0 (0%)	1 (7%)	
– Hip		0 (0%)	0 (0%)	
– Others		11 (11%)	3 (20%)	
Tobacco (yes)		15 (14.6%)	1 (7%)	0.404
– No		88 (85.4%)	14 (93%)	
– 25 PY or less		8 (8%)	1 (7%)	0.662
– More than 25 PY		5 (5%)	0 (0%)	
Alcohol (yes)		12 (11.7%)	5 (33.3%)	0.025
– No		84 (82%)	10 (67%)	
– Occasionally		5 (5%)	4 (27%)	0.034
– Moderate		4 (4%)	1 (7%)	
– Important		3 (3%)	0 (0%)	
Physical exercise				
Low		44 (43%)	5 (33%)	
Moderate		36 (35%)	7 (47%)	0.686
High		14 (14%)	2 (13%)	
Ca (mmol/l)		2.47±0.10/2.46 [0.14]	2.44±0.1/2.46 [0.13]	0.678
CTX (pg/ml)		572±297/525 [336]	682±280/674 [409]	0.061
Vitamin D3 (ng/ml)		21±10/19 [16]	22±13/20 [25]	0.980
Osteocalcin (ng/ml)		28±13.4/26 [14]	34±13/33 [13]	0.027
Tumoral characteristics				
Breast cancer history		14 (14%)	0 (0%)	0.128
Pathology canalar/lobular		85/13 (83%; 13%)	13/2 (87% ; 13%)	0.928
Grade SBR I/II/III		25/61/13 (24%; 59%; 13%)	6/7/2 (40% ; 47% ; 13%)	0.569
Invaded node		27 (26%)	6 (40%)	0.299
ER+/PR+		100/80 (97%; 78%)	15/2 (100% ; 80%)	0.584/0861
Radiotherapy		84 (82%)	12 (80%)	0.885
Chemotherapy		26 (25%)	8 (53%)	0.028

Data shown as mean±S.D./median [interquartile range] and *n* (%).

\**P* values are for the comparison of treatment group with surveillance group (*U* Mann–Whitney and Xie-2).

No significant difference was observed between OFELY control group ( $n=114$ ) and surveillance group ( $n=103$ ) in age (60.6 vs. 60.5;  $p=0.913$ ), in BMI (24.9 vs. 24.1;  $p=0.663$ ) and hip bone mass (0.896 g/cm<sup>2</sup> vs. 0.877 g/cm<sup>2</sup>;  $p=0.132$ ). A slight difference was observed at spine with, respectively, 0.910 g/cm<sup>2</sup> and 0.964 g/cm<sup>2</sup> ( $p=0.016$ ).

### Predictive factors for bone loss

In the surveillance group 25% of patients lost  $\geq 5.6\%$  of BMD at the spine after 1 year and 25% of patients lost  $\geq 4.9\%$  at the hip. Univariate analysis was performed to identify determinants of bone loss, i.e., clinical and biological parameters that differ between the highest quartile of bone loss and the 3 other ones. A recent menopause – 2 years or less – was predictive of bone loss with an odds ratio (OR) of 6.7 (2.15–20.7) ( $p=0.003$ ) for spine and 6.05 [1.95–18.8] ( $p=0.002$ ) for

hip. A complete treatment by chemotherapy ( $\geq 6$  courses) was also predictive with OR of 4.5 [1.6–13] ( $p=0.005$ ) and 3.3 [1.1–9.6] ( $p=0.027$ ) for spine bone loss and for hip bone loss, respectively. A body mass index below 22 kg/m<sup>2</sup> – the lowest quartile in surveillance group – was predictive of spine bone loss with an OR of 5.6 [95% C.I. 2.0–15.6] ( $p=0.002$ ).

We observed that a strong decrease ( $>50\%$ ) of estradiol level between baseline and 1 year was significantly predictive for spine bone loss (OR=3.7 [1.1–12.5],  $p=0.036$ ) and for hip bone loss (OR=4.13 [1.14–14.95],  $p=0.031$ ). A very low estradiol level at

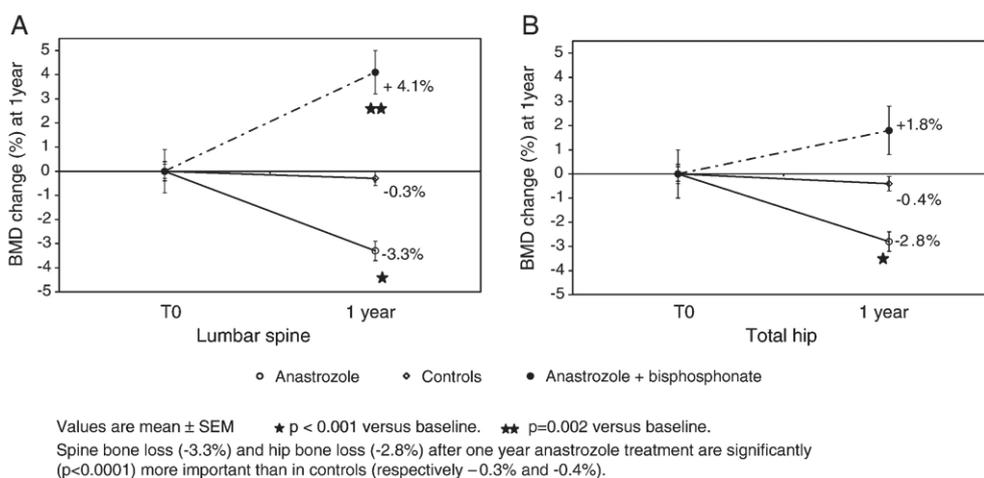


Fig. 2. Lumbar spine (A) and total hip (B) bone mineral density change (%) after 1 year in surveillance (n=90), risedronate treatment (n=11) and OFELY controls (n=114).

1 year (<2 pg/ml) was also predictive for spine bone loss (OR=3.6 [1.1–11.4], p=0.029). We considered as a marked antiestrogenic response to anastrozole either undetectable level of estradiol at 1 year (≤2 pg/ml) or a decrease >50% between baseline and year 1. Such a marked antiestrogenic response was significantly predictive of bone loss with an OR of 5.4 [1.6–17.7] (p=0.008) for spine and 3.43 [1.02–11.51] (p=0.046) for hip. In multivariate logistic model, the marked antiestrogenic response was significantly predictive with an OR of 10.4 [95% C.I. 1.9–57] (p=0.007) for spine bone loss and 5.7 [1.3–25] (p=0.024) for hip bone loss. This indicates that patients with a marked antiestrogenic response to anastrozole had a 5–10 fold increased risk of major bone loss – as defined by the upper quartile – as compared to those without. Recent menopause was also significantly predictive (OR=8.5 [1.3–56], p=0.025) for hip bone loss.

Fracture incidence

During our follow-up, four fractures were observed: two in each group. In the surveillance group, both patients received a calcium–vitamin D supplementation.

Bone mass and bone turnover in the treatment group

After 1 year of combined treatment by anastrozole and risedronate in osteoporotic women, bone loss was prevented at the hip (+1.8±1.0% [-0.2 to 3.8], p=0.131) and BMD significantly increased at the lumbar spine by (+4.1±0.9% [2.3 to 5.9], p=0.008) (Fig. 2). Median BTM decreased by -39% for CTX (p=0.033) and -24% for osteocalcin (p=0.120) and the percent change was significantly different from the percent change observed in the untreated group (Fig. 3).

Discussion

We have shown that anastrozole treatment of breast cancer in postmenopausal osteopenic women induces an accelerated rate of bone loss at the spine and hip as compared to an age matched group of normal postmenopausal women. Anastrozole-induced bone loss is associated with increased bone turnover markers, is significantly related to the suppression of endogenous 17β-estradiol production assessed by plasma 17β-estradiol, and is more pronounced in early postmenopausal patients. In patients

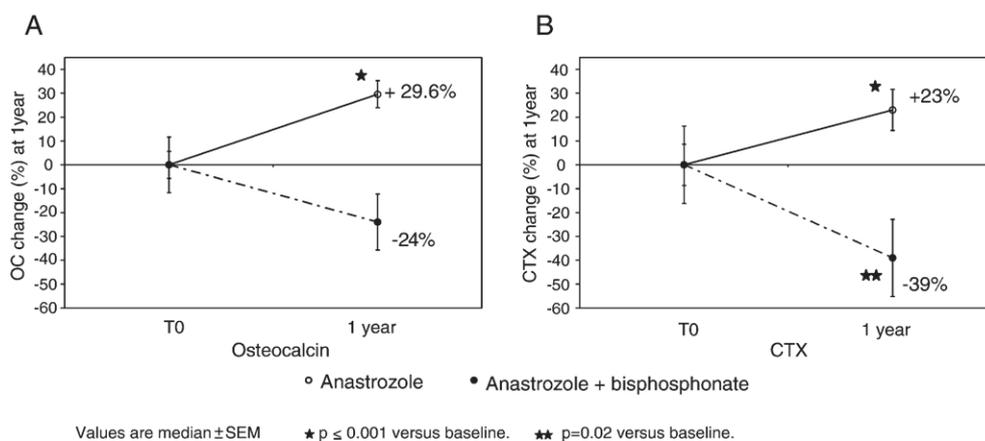


Fig. 3. Osteocalcin (A) and CTX (B) bone turnover markers change (%) after 1 year in surveillance (n=88) and risedronate (n=11) group. The percent changes at 1 year were significantly different between both groups for serum osteocalcin (0.003) and CTX (0.0001).

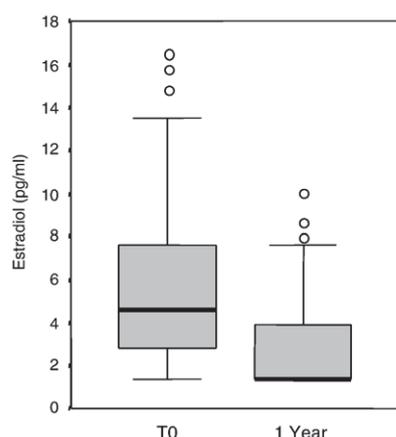


Fig. 4. Serum 17 $\beta$ -estradiol (median; interquartile range) in 57 women before (4.6 pg/ml; 2.1–7.9) and after (1.4 pg/ml; 1.4–3.95) 1 year of treatment with anastrozole ( $p=0.035$ ).

with osteoporosis, i.e., with a  $T$ -score  $\leq -2.5$  S.D., anastrozole-induced bone loss was entirely prevented by weekly risedronate therapy.

A deleterious effect of aromatase inhibitor therapy was suggested by large clinical trials showing an increased incidence of fractures in patients treated with aromatase inhibitors compared to those treated with tamoxifen [13,15]. As in our study, trials with aromatase inhibitor in early breast cancers have recently reported in bone subprotocols an induced rapid bone loss [21–24]. In a study [22], the control group was tamoxifen that prevents – at least in part – postmenopausal bone loss [25] and, therefore, the specific effect of aromatase inhibitor on postmenopausal bone loss cannot be quantified. In the study of Lonning et al. [23], the 2-year bone loss was greater at the hip in the exemestane group compared to the placebo group (2.72% vs. 1.48%,  $p=0.02$ ) but not at the spine (2.17% vs. 1.84%,  $p=0.57$ ), maybe because of the small sample size. In the MA 17 study [24], patients were randomized to letrozole or placebo but they had previously received 5 years of tamoxifen. A significant increase in bone loss was observed after 2 years in letrozole compared to tamoxifen group in lumbar spine ( $-5.35\%$  vs.  $-0.70\%$ ;  $p=0.008$ ) and in total hip ( $-3.60\%$  vs.  $-0.71\%$ ;  $p=0.044$ ). BTM (serum CTX and bone alkaline phosphatase) was increased. The Norwegian Breast Cancer Group failed to show a real induced bone loss difference between exemestane group and placebo group [26]. But in this particular study, 88% of all patients had a vitamin D deficiency. Here we show that bone loss induced by anastrozole is significantly greater than that observed in a large group of healthy postmenopausal women matched by age and body mass index. BMD changes observed in patients with a good prognosis early breast cancer without adjuvant therapy are expected to be similar to the one observed in the OFELY cohort. This is supported by the small nonsignificant changes reported at 1 year in the bone subprotocol control group of the ATAC study [21]. Among early breast cancer adjuvant treatments, chemotherapy intensifies aromatase inhibitor induced bone loss. It acts possibly through two mechanisms: the induced menopause and the direct bone toxicity of the drugs infused

during courses. We showed in univariate analysis that 6 chemotherapy courses were a determinant of bone loss. This multifactorial induced bone loss raises the issue of how and when to prevent bone loss in early breast cancers.

Our study and previous reports support the hypothesis that bone loss might be an aromatase inhibitor class effect. The profound estrogen deficiency induced by aromatase inhibitor is likely to be the primary mechanism for increased bone loss, as reflected by the increased bone turnover that is typical of estrogen deficiency [19,27]. None of these previous studies, however, have directly assessed the effect of the decrease of 17 $\beta$ -estradiol production on the rate of bone loss. Because both the decrease and the absolute level of 17 $\beta$ -estradiol under aromatase inhibitor are important for achieving the antitumoral effect [28], we defined a marked antiestrogenic response by a 50% decrease from baseline or the reach of an undetectable level ( $<2$  pg/ml) using an ultrasensitive radioimmunologic assay. In univariate analysis a low body mass index, an extensive chemotherapy and a recent menopause were associated with increased bone loss as previously described [29]. In our multivariate analysis, the antiestrogenic response to anastrozole was the only significant predictor of major bone loss at both sites.

In osteoporotic patients defined by a  $T$ -score  $\leq -2.5$  S.D. at the spine and/or hip, bone loss was totally prevented by risedronate with a +4.1% increase from baseline at the spine ( $p=0.002$ ). In contrast, calcium and vitamin D supplementation did not modify bone loss in osteopenic patients. Our study raises the issue of the prevention of bone loss and fractures in patients treated with aromatase inhibitors. In the combination group (tamoxifen and anastrozole) of the ATAC bone subprotocol [21], tamoxifen prevented anastrozole induced bone loss, but its antitumoral efficacy is less than anastrozole alone [13]. Bisphosphonate therapy should be considered systematically in patients with  $T$ -score  $\leq -2.5$  S.D. at baseline as their risk of fracture is already high, but the management of osteopenic patients is still unclear. The decision to implement bisphosphonate therapy is likely to be based on baseline BMD level, history of fracture, age, concomitant therapy (such as glucocorticosteroids). Further studies are required to define the standard of care for bone loss prevention in those patients.

Our prospective study has main limitations. First it is designed as an observational nonrandomized open study. Second, plasma 17 $\beta$ -estradiol levels could be assessed at baseline and 1 year in 57 out of 118 women and about half of patients had an unmeasurable level. However, the association between the antiestrogenic response and the magnitude of bone loss was highly significant in this subgroup of patients. Our results are consistent with the dynamic estradiol drop hypothesis to explain the bone loss induced by aromatase inhibitors irrespective of BMD level. Since estradiol results remain statistically weak, further studies are needed to demonstrate it.

In conclusion, anastrozole increases bone turnover and induces accelerated bone loss that is directly related to the suppression of 17 $\beta$ -estradiol production. In osteoporotic women, weekly risedronate prevented anastrozole induced bone loss. Although the antitumoral benefit of aromatase

inhibitor exceeds the risk of increased bone loss and fractures, our data confirm the need for an evaluation of bone status at initiation of therapy, as well as for monitoring of bone loss. Further trials with bisphosphonates are needed to propose clear guidelines for physicians.

### Acknowledgments

We thank Drs C. Faure, A. Meunier, and H. Mignotte for their help in screening patients and M.F. Mallifarges, S. Arnaud, and C. Fadat for their excellent technical assistance.

### References

- [1] Key TJ, Verkasalo PK, Banks E. Epidemiology of breast cancer. *Lancet Oncol* 2001;2(3):133–40.
- [2] Leary A, Dowsett M. Combination therapy with aromatase inhibitors: the next era of breast cancer treatment? *Br J Cancer* 2006;95(6):661–6.
- [3] EBCTCG. Tamoxifen for early breast cancer: an overview of the randomised trials. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. *Lancet* 1998;351(9114):1451–67.
- [4] Cochrane M-A. Tamoxifen for early breast cancer. *Cochrane Database Syst Rev* 2001(1) [CD000486].
- [5] Fontana A, Delmas PD. Selective estrogen receptors modulators in the prevention and treatment of postmenopausal osteoporosis. *Endocrinol Metab Clin N Am* 2003;32(1):219–32.
- [6] Geisler J, Haynes B, Anker G, Dowsett M, Lonning PE. Influence of letrozole and anastrozole on total body aromatization and plasma estrogen levels in postmenopausal breast cancer patients evaluated in a randomized, cross-over study. *J Clin Oncol* 2002;20(3):751–7.
- [7] Geisler J, Lonning PE. Endocrine effects of aromatase inhibitors and inactivators in vivo: review of data and method limitations. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2005;95(1–5):75–81.
- [8] Smith IE, Dowsett M. Aromatase inhibitors in breast cancer. *N Engl J Med* 2003;348(24):2431–42.
- [9] Goss PE, Strasser K. Aromatase inhibitors in the treatment and prevention of breast cancer. *J Clin Oncol* 2001;19(3):881–94.
- [10] Coombes RC, Hall E, Gibson LJ, et al. A randomized trial of exemestane after two to three years of tamoxifen therapy in postmenopausal women with primary breast cancer. *N Engl J Med* 2004;350(11):1081–92.
- [11] Jakesz R, Jonat W, Gnani M, et al. Switching of postmenopausal women with endocrine-responsive early breast cancer to anastrozole after 2 years' adjuvant tamoxifen: combined results of ABCSG trial 8 and ARNO 95 trial. *Lancet* 2005;366(9484):455–62.
- [12] Boccardo F, Rubagotti A, Puntoni M, et al. Switching to anastrozole versus continued tamoxifen treatment of early breast cancer: preliminary results of the Italian Tamoxifen Anastrozole Trial. *J Clin Oncol* 2005;23(22):5138–47.
- [13] Baum M, Budzar AU, Cuzick J, et al. Anastrozole alone or in combination with tamoxifen versus tamoxifen alone for adjuvant treatment of postmenopausal women with early breast cancer: first results of the ATAC randomised trial. *Lancet* 2002;359(9324):2131–9.
- [14] Baum M, Buzdar A, Cuzick J, et al. Anastrozole alone or in combination with tamoxifen versus tamoxifen alone for adjuvant treatment of postmenopausal women with early-stage breast cancer: results of the ATAC (Arimidex, Tamoxifen Alone or in Combination) trial efficacy and safety update analyses. *Cancer* 2003;98(9):1802–10.
- [15] Howell A, Cuzick J, Baum M, et al. Results of the ATAC (Arimidex, Tamoxifen, Alone or in Combination) trial after completion of 5 years' adjuvant treatment for breast cancer. *Lancet* 2005;365(9453):60–2.
- [16] Goss PE, Ingle JN, Martino S, et al. A randomized trial of letrozole in postmenopausal women after five years of tamoxifen therapy for early-stage breast cancer. *N Engl J Med* 2003;349(19):1793–802.
- [17] Thurlimann B, Keshaviah A, Coates AS, et al. A comparison of letrozole and tamoxifen in postmenopausal women with early breast cancer. *N Engl J Med* 2005;353(26):2747–57.
- [18] Arlot ME, Sornay-Rendu E, Garnero P, Vey-Marty B, Delmas PD. Apparent pre- and postmenopausal bone loss evaluated by DXA at different skeletal sites in women: the OFELY cohort. *J Bone Miner Res* 1997;12(4):683–90.
- [19] Garnero P, Sornay-Rendu E, Chapuy MC, Delmas PD. Increased bone turnover in late postmenopausal women is a major determinant of osteoporosis. *J Bone Miner Res* 1996;11(3):337–49.
- [20] Fardelone P, Sebert J, Bouraya M, et al. Evaluation de la teneur en calcium du régime alimentaire par autoquestionnaire fréquentiel. *Rev Rhum Mal Osteo-artic* 1991(58):99–103.
- [21] Eastell R, Hannon RA, Cuzick J, Dowsett M, Clack G, Adams JE. ATAC Trialists' group. Effect of an aromatase inhibitor on bmd and bone turnover markers: 2-year results of the Anastrozole, Tamoxifen, Alone or in Combination (ATAC) trial (18233230). *J Bone Miner Res* 2006;21(8):1215–23.
- [22] Gonnelli S, Cadiri A, Caffarelli C, Petrioli R, Montagnani A, Franci MB, et al. Changes in bone turnover and in bone mass in women with breast cancer switched from tamoxifen to exemestane. *Bone* 2007;40(1):205–10.
- [23] Lonning PE, Geisler J, Krag LE, Erikstein B, Bremnes Y, Hagen AI, et al. Effects of exemestane administered for 2 years versus placebo on bone mineral density, bone biomarkers, and plasma lipids in patients with surgically resected early breast cancer. *J Clin Oncol* 2005;23(22):5126–37.
- [24] Perez EA, Josse RG, Pritchard KI, Ingle JN, Martino S, Findlay BP, et al. Effect of letrozole versus placebo on bone mineral density in women with primary breast cancer completing 5 or more years of adjuvant tamoxifen: a companion study to NCIC CTG MA.17. *J Clin Oncol* 2006;24(22):3629–35.
- [25] Love RR, Mazess RB, Tormey DC, Barden HS, Newcomb PA, Jordan VC. Bone mineral density in women with breast cancer treated with adjuvant tamoxifen for at least two years. *Breast Cancer Res Treat* 1988;12(3):297–302.
- [26] Geisler J, Lonning PE, Krag LE, Lokkevik E, Risberg T, Hagen AI, et al. Changes in bone and lipid metabolism in postmenopausal women with early breast cancer after terminating 2-year treatment with exemestane: a randomised, placebo-controlled study. *Eur J Cancer* 2006;42(17):2968–75.
- [27] Garnero P, Sornay-Rendu E, Claustrat B, Delmas PD. Biochemical markers of bone turnover, endogenous hormones and the risk of fractures in postmenopausal women: the OFELY study. *J Bone Miner Res* 2000;15(8):1526–36.
- [28] Miller WR, Anderson TJ, White S, et al. Aromatase inhibitors: cellular and molecular effects. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2005;95(1–5):83–9.
- [29] Delmas PD, Balena R, Confavreux E, Hardouin C, Hardy P, Bremond A. Bisphosphonate risedronate prevents bone loss in women with artificial menopause due to chemotherapy of breast cancer: a double-blind, placebo-controlled study. *J Clin Oncol* 1997;15(3):955–62.

## VI- Perspectives

### 1) Perte osseuse sous anti-aromatase : résultats des sous-protocoles osseux des études princeps

Les sous protocoles osseux des études de phase III sur le traitement adjuvant des cancers du sein hormonodépendants par anti-aromatase ont été publiés parallèlement à notre travail. Eastell *et al.* ont présenté les résultats de l'étude ATAC à deux ans dans un sous-groupe de 308 femmes ménopausées réparties dans chacun des trois groupes de traitements : tamoxifène, anastrozole ou traitement combiné par anastrozole plus tamoxifène. Comme dans notre travail, les patientes traitées par anastrozole ont une activation précoce du remodelage osseux (mesure à 3, 6 et 12 mois) observée pour chacun des marqueurs osseux: CTX, NTX urinaires, P1NP et PAL osseuses. L'activation du remodelage osseux s'associe à une perte significative de masse osseuse aussi bien en lombaire (-4.1% sous anastrozole vs +2.2% tamoxifène) qu'en fémoral (-3.9% sous anastrozole vs +1.2% sous tamoxifène)<sup>254</sup>. A cinq ans, une nouvelle évaluation densitométrique montre la poursuite de la perte osseuse avec toujours un décalage entre anastrozole et tamoxifène: -6.08% sous anastrozole versus -2.77% sous tamoxifène à la colonne lombaire et -7.24% vs -0.74% à la hanche totale<sup>255</sup>. Les résultats présentés sous forme de catégorie densitométrique (ostéoporose, ostéopénie, normal) sont également en défaveur de l'anastrozole avec 11 % des patientes à 36 mois dans le groupe « ostéoporose ou ostéopénie » versus 7% dans le groupe tamoxifène. Néanmoins la balance bénéfique/risque reste jugée favorable pour l'anastrozole par rapport au tamoxifène<sup>256</sup>.

Le sous protocole osseux de l'étude MA17, étudiant le létrozole en relais après cinq ans de tamoxifène, a inclus 226 patientes (122 dans le groupe létrozole, 104 dans le groupe placebo). L'âge moyen des patientes était de 60,7 ans et plus de 80 % des patientes avaient moins de 70 ans. Après 24 mois de traitement, les patientes sous létrozole ont une diminution de masse osseuse significativement plus importante que celles sous placebo aussi bien à la hanche (-3.6% vs -0.71%;  $p < 0.05$ ) qu'à la colonne lombaire (-5.35% vs -0.70%;  $p=0.008$ ). Cette perte osseuse s'accompagne d'une augmentation de la résorption osseuse (NTX urinaires) à 6,12, et 24 mois<sup>257</sup>. Dans cette étude aucune des patientes n'a franchi le seuil densitométrique d'ostéoporose à la hanche. En somme, dans ce deuxième type de schéma d'hormonothérapie basée sur l'ajout d'une anti-aromatase après cinq ans de tamoxifène en adjuvant, le létrozole est responsable d'une fragilisation osseuse avec réduction de la densitométrie osseuse et augmentation de la résorption.

L'exemestane (25mg/j) a une structure stéroïdienne. Elle est la troisième anti-aromatase utilisée comme hormonothérapie adjuvante. Il n'était pas prévu de sous-protocole osseux dans l'étude princeps. Un protocole osseux contre placebo réalisé en double aveugle chez 147 femmes ménopausées présentant un cancer du sein localisé hormonodépendant est par contre disponible. Les résultats à deux ans sont exprimés sous forme de vitesse moyenne de perte osseuse annuelle. Le résultat n'est pas significatif au niveau lombaire mais est significatif au site fémoral avec une vitesse de perte de 2.72% sous exemestane vs 1.48% sous placebo ( $p=0.024$ ).

Comme les deux autres molécules, l'exemestane est responsable d'une augmentation significative du remodelage osseux par rapport au placebo <sup>258</sup>. Dans une autre étude adjuvante ouverte allemande répartissant les patientes entre exemestane (n=78) pendant 5 ans versus tamoxifène (n=83) pendant 2 ans 1/2 suivi d'exemestane 2 ans 1/2, la mise sous exemestane s'accompagne d'une accélération du remodelage osseux (PAL osseuses, CTX, P1NP et ostéocalcine) précoce dès trois mois qui reste ensuite significative à 6 mois et 12 mois. À l'inverse la mise sous tamoxifène s'accompagne d'une diminution du remodelage osseux <sup>259</sup>.

A la vue des résultats de l'étude de Lønning <sup>258</sup>, la question était de savoir si l'exemestane était responsable d'une perte osseuse moindre que celle observée avec les autres anti-aromatase (létrozole, anastrozole). Ce fut l'objet d'une intense controverse entre les firmes pharmaceutiques évoquant notamment la structure stéroïdienne de l'exemestane pour jouer un rôle protecteur.

Dans ce débat, on note que l'anastrozole a été évalué non pas contre placebo mais contre le tamoxifène qui appartient comme le raloxifène à la classe des SERM et a donc un effet protecteur osseux. Ceci a probablement majoré la différence par rapport à la comparaison directe avec un placebo.

Concernant le létrozole, la comparaison a été réalisée contre placebo mais après cinq ans de tamoxifène exerçant là encore probablement un effet protecteur osseux modéré. L'arrêt du tamoxifène a certainement majoré la résorption osseuse.

Il n'existe pas d'étude de large envergure comparant directement l'effet osseux des anti-aromatases. Seule est disponible une étude japonaise comparant le tamoxifène, l'exemestane et l'anastrozole. Les effectifs sont faibles. Il existe une différence entre la perte osseuse induite par les anti-aromatases et le tamoxifène mais pas de différence entre les deux anti-aromatases <sup>260</sup>. Il existe également une étude de phase I ouverte qui montre à 24 semaines une accélération similaire du remodelage osseux entre les différentes anti-aromatases. Dans cette étude, l'exemestane avait un profil lipidique altéré par rapport aux autres anti-aromatase avec une baisse du HDL-cholestérol et une altération du ratio LDL/HDL incitant à la prudence chez les patientes aux antécédents cardio-vasculaires <sup>261</sup>. Des études plus détaillées sur les modifications du profil lipidique sont en cours.

Dans notre travail, nous avons observé que l'élément déterminant était l'intensité de la castration œstrogénique, soit parce que le niveau était indosable soit parce que la variation de l'œstradiolémie avant et après 1 an de traitement était >50%. Les trois anti-aromatases possédant un pouvoir anti-œstrogénique intense (>95 %) et similaire, à notre avis, l'activation du remodelage osseux et la perte osseuse rapide observées sous anti-aromatase relèvent plutôt d'un effet de classe. Les anti-aromatases font donc partie des traitements anticancéreux responsables d'une perte osseuse (*Cancer Treatment Induced Bone Loss - CTIBL*) et il est nécessaire de réaliser une évaluation osseuse avant la mise sous traitement hormonal adjuvant chez les patientes présentant un cancer du sein hormonodépendant localisé <sup>262, 263</sup>.

## 2) Prévention de la perte osseuse induite par les anti-aromatases

Nous avons observé que le risédronate chez les patientes ostéoporotiques à l'inclusion permettait une prévention efficace de la perte osseuse induite par les anti-aromatases. Deux autres études réalisées avec le risédronate sont disponibles. La première menée par Serge *et al.* montre une prévention efficace de la perte osseuse chez les patientes ostéopéniques (T-score <-2 DS) ou avec un antécédent fracturaire (T score >-2DS et au moins une fracture). D'autres études ont montré l'efficacité de la prévention de la perte osseuse par le risédronate chez les patientes stratifiées en fonction de leur T-score densitométrique. Dans ces études, les patientes à faible risque densitométrique n'étaient pas traitées et ont eu une perte osseuse significative comme attendu. Les patientes à risque densitométrique élevé ont été traitées systématiquement par le risédronate avec une bonne efficacité préventive de la perte osseuse. Enfin les patientes à risque intermédiaire étaient randomisées entre placebo et risédronate. Le risédronate prévenait la perte osseuse des patientes à 12 et 24 mois <sup>264, 265</sup>.

Logiquement, le traitement préventif de la perte osseuse a été évalué avec l'acide zolédronique. Différents schémas ont été utilisés. L'étude de Hines *et al.* a utilisé un schéma d'injections semestrielles. Après un an de traitement par létrozole, l'acide zolédronique prévient la perte osseuse induite <sup>266</sup>. C'est également le cas pour l'étude de Safra *et al.* réalisée chez des femmes traitées deux ans et demi par tamoxifène suivi de deux ans et demi de létrozole <sup>267</sup>.

Plus récemment, les résultats d'une stratégie différente, comparant l'utilisation de l'acide zolédronique semestriel dès l'instauration de l'anti-aromatase ou de façon retardée une fois que les patientes présentaient soit une fracture soit un T-score <-2 DS, ont été présentés. Ces deux études jumelées Z-FAST et ZO-FAST ont montré l'intérêt du traitement immédiat dont l'efficacité est nettement supérieure pour prévenir la perte osseuse induite par l'anti-aromatase. En revanche ces deux études n'ont pour l'instant pas mis en évidence de bénéfice antitumoral malgré un suivi de cinq ans <sup>268-270</sup>.

Il existe encore peu d'études avec le dénosumab en prévention de la perte osseuse induite par les anti-aromatases. Dans une étude préliminaire réalisée contre placebo (n=127), le dénosumab à doses semestrielles (60 mg en sous cutané) s'est révélé efficace avec un gain de masse osseuse à un an à la colonne lombaire de 5.5% <sup>271</sup>. Plus tard, un sous-groupe d'une étude de phase III a confirmé l'intérêt du denosumab en adjuvant sur la prévention de la perte osseuse induite par les anti-aromatases <sup>272</sup>.

### 3) **Recommandations pour la prise en charge osseuse avant la mise sous anti-aromatase pour un cancer du sein hormonodépendant localisé de la femme ménopausée**

Plusieurs sociétés savantes internationales ont réalisé et mis à jour des recommandations pour la pratique du clinicien<sup>262, 263, 273</sup>. Toutes s'accordent pour recommander la réalisation d'une évaluation osseuse avant la mise en route d'un traitement par anti-aromatase en tant qu'hormonothérapie adjuvante de la femme ménopausée présentant un cancer du sein hormonodépendant localisé. Il apparaît essentiel de préserver la santé osseuse de ces patientes dont le pronostic à long terme est excellent. Les recommandations soulignent que la perte osseuse induite par les anti-aromatases conduit à l'augmentation de l'incidence fracturaire par rapport au tamoxifène. Étant donné la rapidité de la perte osseuse induite par les anti-aromatase, la densitométrie osseuse initiale doit être réalisée dans les 3 mois suivant l'instauration de l'anti-aromatase. Les recommandations soulignent également que la perte osseuse est d'autant plus intense que les patientes concernées sont jeunes et reçoivent en plus une castration chimique par agoniste de LH-RH lors de la mise sous anti-aromatase. Un algorithme spécifique a d'ailleurs été développé pour les patientes avec une ménopause précoce induite<sup>263</sup>.

Le seuil d'intervention retenu pour la mise en route d'un bisphosphonate combine l'âge, la recherche des facteurs classiques de risque de fragilité osseuse et le résultat de la densitométrie<sup>263</sup>.

Pour l'instant, le choix du bisphosphonate reste le choix du clinicien : forme orale hebdomadaire (alendronate 70mg, risédronate 35 mg), forme orale mensuelle (ibandronate 150mg), ou forme intraveineuse (ibandronate 3mg trimestriel, acide zoledronique 4mg semestriel). La préférence ira vers les formes injectables compte tenu de la meilleure observance et du plus grand nombre de preuve de l'activité anti-tumorale avec l'acide zolédronique. Le traitement par bisphosphonate reste contre-indiqué en cas de débit de filtration glomérulaire bas (<30 ml /minute) ce qui n'est pas le cas avec le dénosumab.

**Synopsis des recommandations (hors femmes jeunes avec ménopause induite) :**

- **Pour les patientes, quel que soit leur âge, ayant déjà présenté une fracture par fragilité osseuse**, un traitement par bisphosphonate est indiqué quelque soit la valeur de la densitométrie osseuse.
- **Pour les patientes de plus de 75 ans ou de moins de 75 ans mais avec au moins un facteur de risque osseux majeur**, un traitement par bisphosphonate est recommandé quelque soit la mesure de la densitométrie osseuse.
- **Pour les patientes de moins de 75 ans ou sans facteur de risque osseux majeur**, trois groupes sont distingués.
  - Le groupe à **haut risque avec un T-score initial <- 2DS** quelque soit le site doit être traité après correction de la carence en vitamine D par une supplémentation vitaminocalcique, des conseils de mode de vie (activité physique) et un bisphosphonate. Une réévaluation densitométrique est recommandée après deux ans de traitement.
  - Le groupe à **risque moyen (T-score entre -1 et -2 DS)** relève uniquement d'une supplémentation vitaminocalcique et une activité physique régulière. Une réévaluation densitométrique doit être réalisée après deux ans de traitement.  
Un rythme de perte osseuse supérieur à 4 % par an ou un T score <- 2DS à la hanche ou au rachis sera considéré comme pathologique et nécessitera la mise en route d'un traitement.
  - Le groupe à **faible risque (T score > 1 DS)** ne nécessite pas de mesure préventive autre qu'une activité physique régulière et la prévention des facteurs de risque osseux (alcool, tabac). Le risque de développer une ostéoporose densitométrique dans les cinq ans pour ce groupe est considéré comme très bas.

**Facteurs de risques osseux majeurs**<sup>263</sup>

- Antécédent de fracture par fragilité après 50 ans
- Antécédent familial du 1<sup>er</sup> degré de fracture de hanche
- Ménopause précoce
- Indice de masse corporelle <22 kg/m<sup>2</sup>
- Consommation d'alcool de plus de 4 UI/j
- Corticothérapie orale >7.5mg/j pendant 3 mois
- Pathologie augmentant le risque fracturaire : hyperthyroïdie, rhumatisme inflammatoire chronique (polyarthrite rhumatoïde, spondylarthrite ankylosante), immobilisation prolongée, maladie de Crohn

Il est possible de discuter ces recommandations qui sont basées sur la DMO et sur l'évaluation du risque fracturaire mais pas sur le métabolisme osseux. Étant donné le pronostic excellent à long terme de cette population de patientes, il est légitime d'envisager la santé osseuse de ces patientes à très long terme (20-25 ans). Par analogie avec le développement de la masse osseuse dans l'enfance et l'importance d'optimiser le pic de masse osseuse pour préserver l'avenir, on peut légitimement s'interroger sur les conséquences d'un traitement par anti-aromatase qui va altérer l'os même si le risque osseux lors de la prescription est faible ou nul. Cette altération osseuse produite au milieu de la vie peut avoir des conséquences importantes durant la vieillesse et notamment sur le risque de fracture du col du fémur. L'analyse de la perte osseuse induite par les anti-aromatases montre que le traitement va surtout provoquer une perte osseuse très précocement au début du traitement durant les 18 premiers mois. Par la suite la vitesse de perte osseuse diminue et on peut penser qu'il y a, sans doute de façon similaire à la ménopause physiologique, une adaptation de l'organisme et un retour à une perte plus lente. La perte du capital osseux induite précocement par ce traitement ne sera sans doute pas récupérable pour l'avenir. Une proposition de protocole thérapeutique basé sur le métabolisme osseux et la vision à long terme serait

- 1) de réaliser l'évaluation osseuse lors de l'instauration de l'anti-aromatase et de corriger une éventuelle carence en vitamine D ;
- 2) puis, le temps que l'organisme s'adapte, de réaliser un traitement systématique (1 injection unique d'acide zolédronique par exemple) au moment de l'instauration de l'anti-aromatase ou dès le début de la chimiothérapie si celle-ci doit être faite.
- 3) La réévaluation à 1 an permettrait de décider ou non la poursuite du traitement selon les algorithmes déjà développés.

Il y a un rationnel oncologique à proposer un traitement précoce par bisphosphonate qui freine et maintient le remodelage osseux bas même après l'arrêt du traitement. Cela participe au blocage du cercle vicieux dans les métastases osseuses et à la survie des patients<sup>274</sup>. Il y a potentiellement également un bénéfice anti-tumoral précoce sur le « homing » et tardif sur « la rupture de dormance »<sup>275, 276</sup>. Comme cette population a globalement un excellent pronostic à long terme le bénéfice d'une telle survie reste difficile à démontrer en clinique.

## **C/ Effet de l'ostéocalcine sur la physiologie de la reproduction chez l'homme**

### **I- Physiologie de la reproduction chez l'homme**

#### **1) Anatomie des organes reproducteurs masculins <sup>8</sup>**

Les organes génitaux masculins comprennent le pénis et le scrotum. Le scrotum est une bourse faite de tissu conjonctif et musculaire, recouverte de peau et qui contient le testicule et l'épididyme. Figure 23. Testicule et épидидyme sont reliés à la cavité périnéale par l'intermédiaire du cordon spermatique qui contient : le canal déférent, la veine testiculaire et l'artère testiculaire. Figure 24. La localisation extra abdominale du testicule dans le scrotum est un point essentiel pour la production normale des spermatozoïdes, possible uniquement à une température inférieure à celle du corps. Le maintien de la température idéale du testicule est assuré par le muscle crémasterien qui en se contractant où se relâchant rapproche ou éloigne le testicule du corps, modulant ainsi sa température.

Les testicules ont deux fonctions chez l'adulte : la production de spermatozoïdes et la production des hormones sexuelles mâles. Chaque testicule contient un grand nombre de tubules étroitement enroulés, appelés tubes séminifères, dans lesquels se déroule la spermatogenèse.

Les cellules de Sertoli sont situées à l'intérieur des tubes séminifères contre la membrane basale et sont étroitement attachées entre elles par des jonctions intercellulaires formant une couche cellulaire à la base des tubes séminifères. Cette couche cellulaire forme une barrière entre le sang et la spermatogenèse. Elle est essentielle pour éviter l'entrée de substances toxiques dans les tubes séminifères et également éviter la diffusion des spermatozoïdes à l'extérieur des tubes séminifères. En effet les spermatozoïdes matures sont très immunogènes et risqueraient d'être à l'origine d'une destruction immunitaire des testicules. Les cellules de Sertoli servent également à produire du liquide extracellulaire dans la lumière des tubes séminifères dont la composition est riche en protéines, enzymes, nutriments et ions nécessaires pour soutenir la spermatogenèse. Ces cellules sont également responsables de la phagocytose des débris des cellules germinales. Les cellules de Sertoli ont un rôle endocrinien par la production d'inhibine sous la dépendance de la FSH (Follicle-Stimulating Hormone). L'inhibine est une hormone sécrétée dans le sang qui donne un rétrocontrôle négatif à l'antéhypophyse. Enfin, les cellules de Sertoli sécrètent dans le liquide extracellulaire une protéine de liaison aux androgènes ou ABP (androgen binding protein) qui lie la testostérone et permet ainsi d'augmenter sa concentration dans le liquide extracellulaire à l'intérieur des tubes séminifères.

Entre les tubes séminifères, il existe un tissu interstitiel comprenant des vaisseaux lymphatiques, des vaisseaux sanguins, des fibres nerveuses, du tissu de soutien et les cellules de Leydig qui produisent la testostérone sous l'effet de la LH (Luteinizing Hormone). Figure 25.

## 2) Spermatogenèse <sup>8</sup>

La spermatogenèse regroupe les mécanismes qui permettent la production de spermatozoïdes dans les tubes séminifères. Les cellules germinales primitives appelées spermatogonies peuvent être considérées comme des cellules souches. Elles sont présentes dans le testicule durant le développement embryonnaire et l'enfance. Avant la puberté elles se divisent uniquement par mitose pour augmenter leur nombre. C'est seulement après la puberté que le processus complet de spermatogenèse se met en place et ne cessera jamais même si son intensité diminuera après 45 ans. La durée complète du processus de spermatogenèse est de 70 à 80 jours. C'est un processus permanent expliquant qu'au sein d'un même tube séminifère on trouve tous les stades de différenciation. Le processus se déroule de la membrane basale vers la lumière des tubes séminifères où les spermatozoïdes seront libérés puis migreront vers l'épididyme.

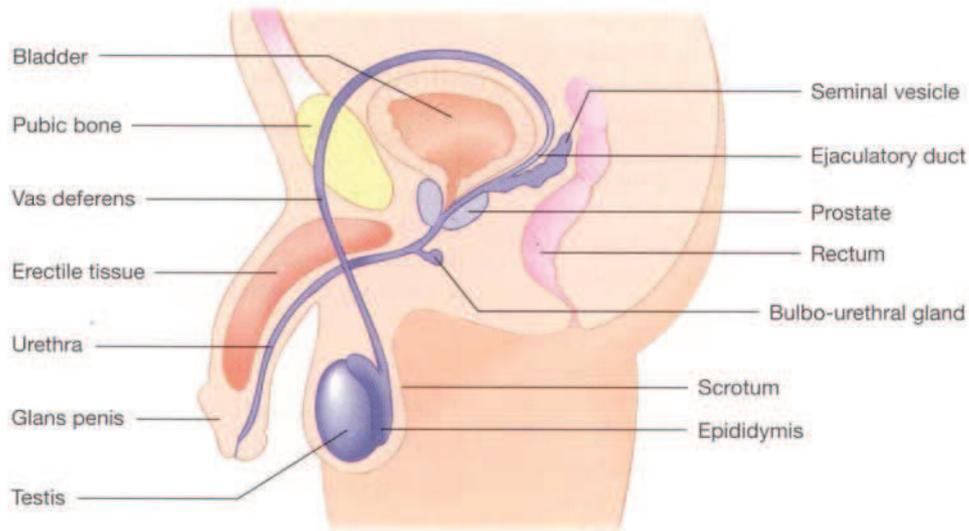
Les spermatogonies entrent régulièrement en mitose pour se diviser et maintenir le réservoir de cellules germinales primitives. Par moments, un spermatogonie s'hypertrophie et se différencie en spermatocyte primaire. Le spermatocyte primaire (46 chromosomes) subit une première division par méiose pour produire deux spermatocytes secondaires (23 chromosomes recombinaison chacun) qui subiront chacun eux aussi une seconde division par méiose et donner quatre spermatides (23 chromosomes recombinaison chacun). Ces deux méioses successives permettent la recombinaison au hasard des chromosomes homologues par un phénomène de crossing over. Ces échanges aléatoires de segments chromosomiques sont à l'origine de l'infinie diversité des individus. La maturation finale des spermatides en spermatozoïdes est un processus très complexe appelé spermiogenèse. Figure 26 et 27.

## 3) Action biologique paracrine de la testostérone sur la spermatogenèse

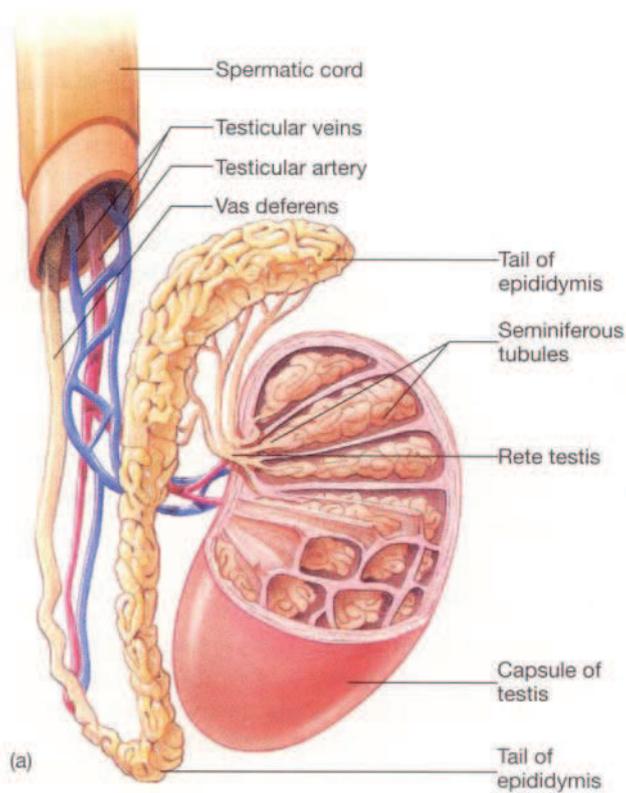
Suite à la stéroïdogénèse, la testostérone est sécrétée dans le liquide extracellulaire du tissu interstitiel entourant les tubes séminifères d'où elle diffuse à l'intérieur des tubes séminifères pour agir sur la spermatogenèse. La spermatogenèse requiert une concentration élevée de testostérone dans les tubes séminifères. Une diminution des taux de testostérone intratubulaire peut être responsable de stérilité.

La testostérone agit en différents points de la spermatogenèse : elle soutient les mitoses des spermatogonies pour maintenir le réservoir de cellules germinales <sup>277</sup>, elle stimule la seconde division méiotique pour produire les spermatides, elle favorise la spermiogenèse et agit également sur la production d'androgen binding protein (ABP) par les cellules de Sertoli pour augmenter sa propre concentration intratubulaire.

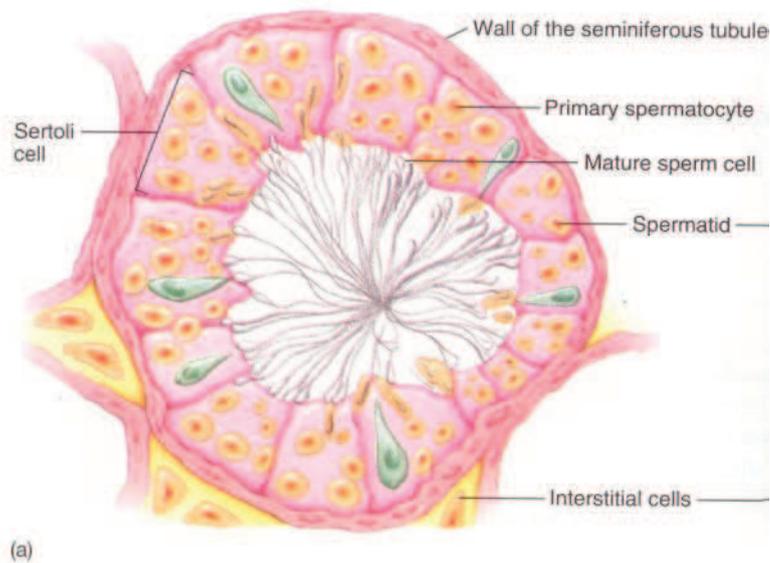
**Figure 23** : anatomie des organes génitaux masculins internes et externes. Coupe sagittale. Tiré de Rhoades and Pflanzler, Saunders.1996.<sup>8</sup>



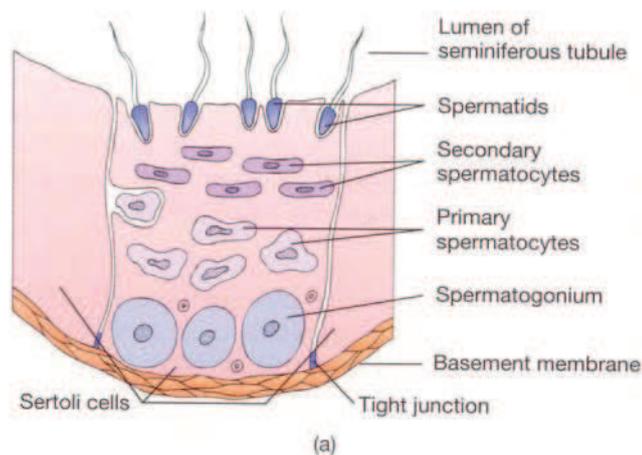
**Figure 24** : vue anatomique du contenu scrotal : testicule, epididyme et cordon spermatique. Tiré de Rhoades and Pflanzler, Saunders.1996.<sup>8</sup>



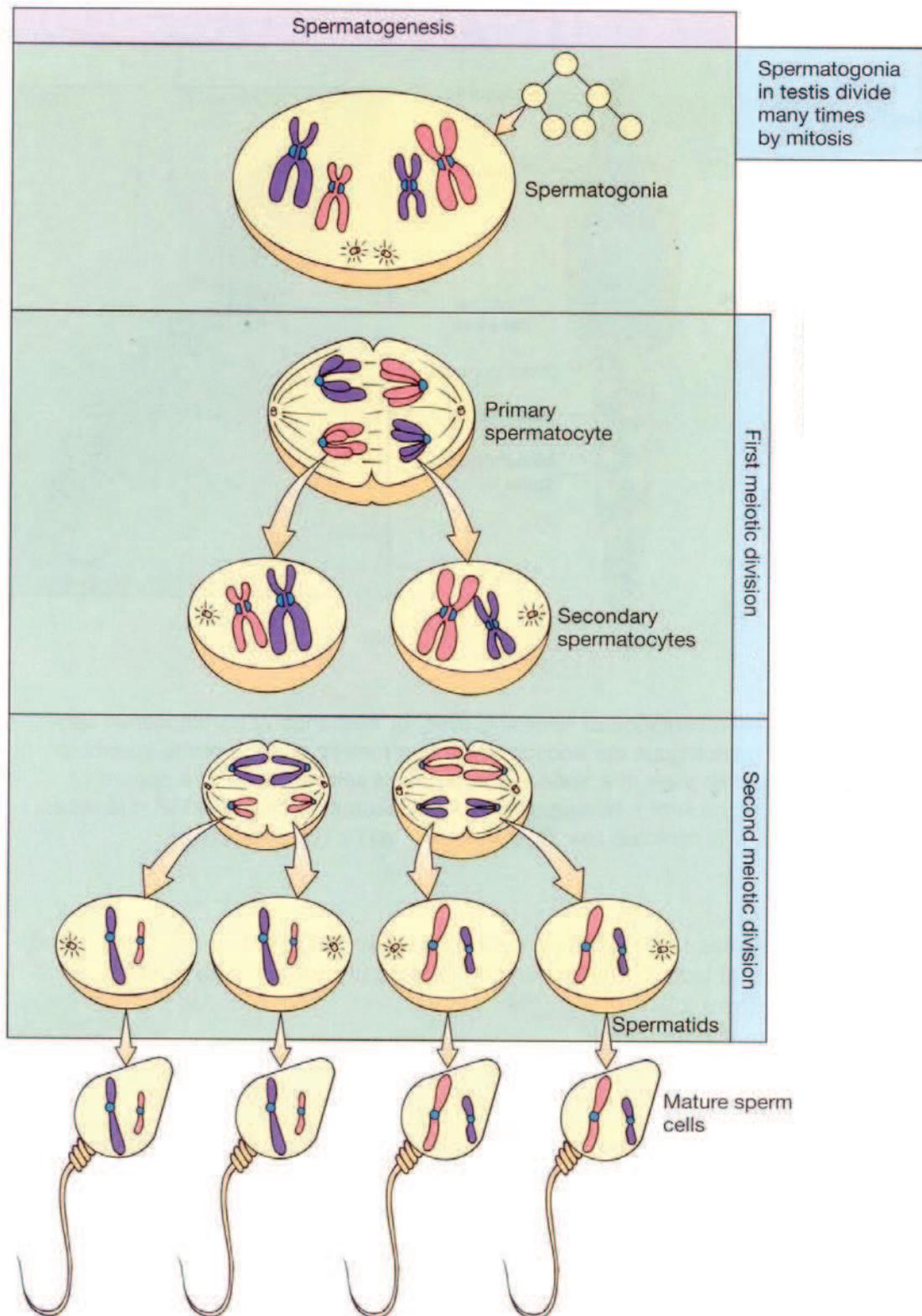
**Figure 25 :** coupe axiale d'un tube séminifère. Les cellules de Sertoli sont intratubulaires et les cellules de Leydig sont dans les espaces interstitiels.  
Tiré de Rhoades and Pflanzler, Saunders.1996.<sup>8</sup>



**Figure 26 :** vue synthétique montrant les différentes étapes de la spermatogenèse sur coupe axiale d'un tube séminifère : des spermatogonies périphériques en direction des spermatozoïdes relargués dans la lumière tubulaire.  
Tiré de Rhoades and Pflanzler, Saunders.1996.<sup>8</sup>



**Figure 27** : étapes de divisions cellulaires au cours de la spermatogenèse.  
Tiré de Rhoades and Pflanzler, Saunders.1996.<sup>8</sup>



La spermiogenèse est un processus complexe durant lequel les spermatides ne subissent pas de division cellulaire mais une succession de changements cytologiques permettant leur différenciation en spermatozoïdes matures. Parmi ces changements, le matériel génétique ou chromatine se condense dans le noyau de la tête du spermatozoïde et est protégé par une membrane. La moitié antérieure de la tête du spermatozoïde est recouverte d'une structure appelée acrosome différenciée à partir du Golgi et contenant de multiples enzymes nécessaires à la fertilisation. La partie médiane du spermatozoïde contient de nombreuses mitochondries essentielles pour produire l'énergie nécessaire au déplacement. Enfin la queue ou flagelle formée de multiples filaments produit les battements qui permettent la propulsion en avant du spermatozoïde.

En somme, la testostérone ne déclenche pas la spermatogenèse (pas d'action sur la première mitose) mais possède une action de régulation quantitative de la production finale de spermatozoïdes par une action plutôt distale sur la spermatogenèse (spermiogenèse et seconde meiose).

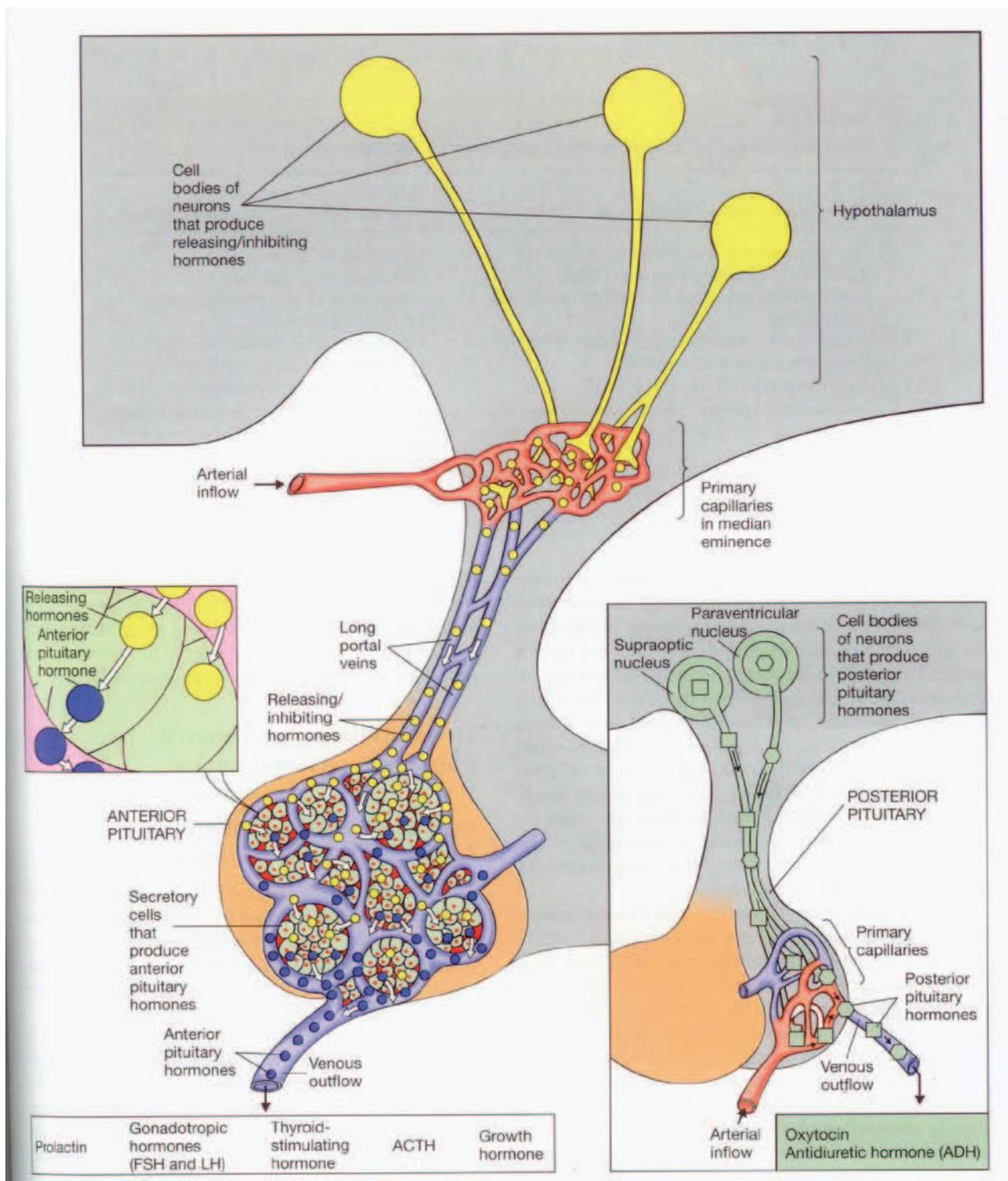
#### **4) Contrôle neuroendocrine de la fertilité masculine : « l'axe hypothalamus-hypophyse -testicule »**

Le contrôle neuroendocrine de la fertilité chez l'homme implique des interactions entre l'hypothalamus, l'hypophyse et les testicules. Les neurones endocrines de l'hypothalamus sécrètent dans les capillaires de l'éminence médiane le GnRH (Gonadotropin Releasing Hormone) qui est transporté jusqu'à la partie antérieure de l'hypophyse par le réseau veineux porte hypothalamo-hypophysaire. Figure 28. Lorsque le GnRH arrive à l'antéhypophyse chez l'homme, il stimule la libération dans le sang des hormones gonadotropes LH et FSH qui agiront dans les testicules respectivement sur les cellules interstitielles de Leydig et sur les cellules de Sertoli dans les tubes séminifères. LH stimule la production de testostérone et FSH stimule la différenciation des spermatogonies en spermatoocytes primaires.

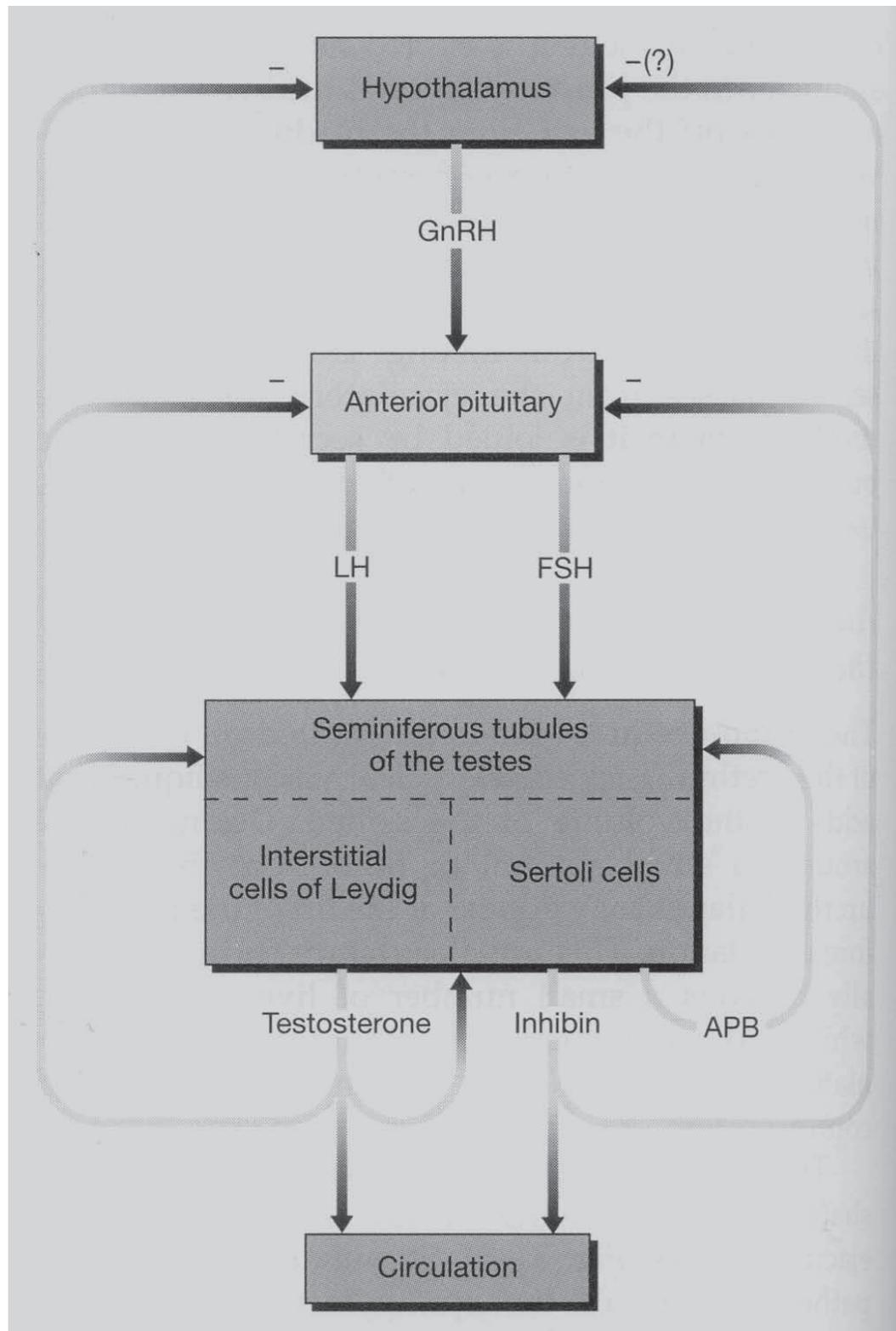
La sécrétion de GnRH, LH et FSH est globalement constante d'un jour à l'autre chez l'homme. Cette stabilité est due à l'existence d'un rétrocontrôle négatif continu par les testicules sur l'antéhypophyse et l'hypothalamus via la testostérone pour LH et l'inhibine pour la FSH. Figure 29.

En plus de ces rétrocontrôles négatifs de la testostérone et de l'inhibine sur l'antéhypophyse et l'hypothalamus, l'hypothalamus reçoit de nombreuses projections neuronales en provenance des différentes aires cérébrales recevant des stimuli sensoriels. Ainsi la vision, l'olfaction, le tact, les pensées et les humeurs peuvent-ils altérer la sécrétion de GnRH. Par exemple, le stress, les exercices physiques très intenses ou des stimulations purement imaginatives peuvent inhiber transitoirement la production de spermatozoïdes chez l'homme et interrompre les menstruations chez la femme.

**Figure 28 :** réseau veineux porte hypothalamo-hypophysaire et sécrétion neuro-endocrine de l'hypothalamus en direction de l'antéhypophyse.  
Tiré de Rhoades and Pfanzer, Saunders.1996.<sup>8</sup>



**Figure 29 :** axe fonctionnel hypothalamo-hypophysaire-testiculaire montrant les rétrocontrôles négatifs centraux de la testostérone et de l'inhibine.  
Tiré de Rhoades and Pflanzler, Saunders.1996.<sup>8</sup>



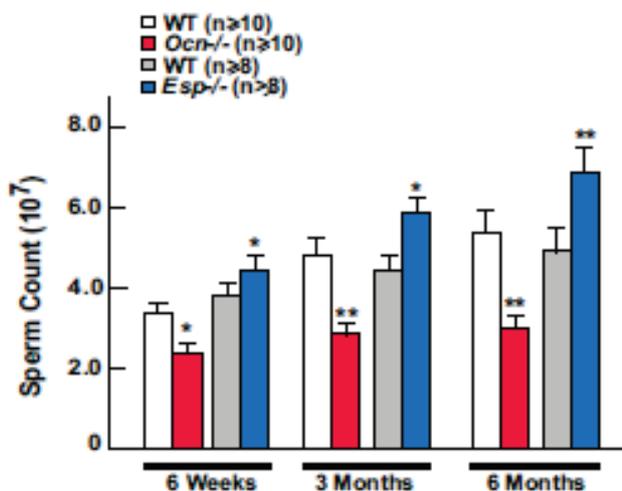
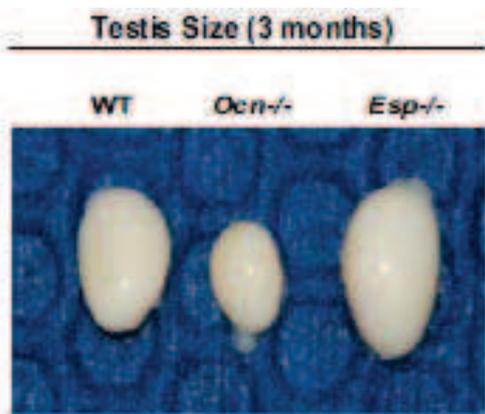
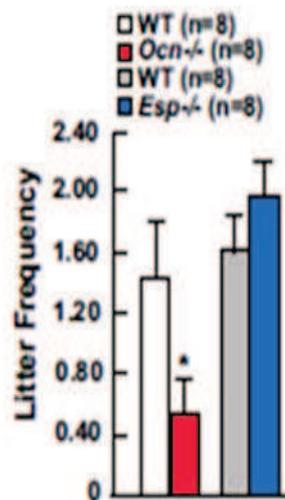
### 5) Contrôle osseux de la fertilité masculine par l'ostéocalcine

#### Ostéocalcine, testostérone et spermatozoïdes

À l'occasion de notre travail sur le rôle de l'ostéocalcine dans la régulation du métabolisme énergétique, il avait été noté que les souris déficientes en *ostéocalcine* (*Ocn*<sup>-/-</sup>) se reproduisaient moins bien que les souris sauvages. Une surveillance plus systématique du nombre de portées mensuelles de ces souris a fait clairement apparaître des portées moins fréquentes que les souris sauvages. À l'inverse les souris déficientes en *Esp* avaient plutôt une augmentation (non significative) du nombre de portées mensuelles. Figure 30. Cette observation fut à la base d'un nouveau champ d'investigations concernant l'ostéocalcine et la fertilité. Nous résumons ici les points clés de la démonstration <sup>1</sup>.

La comparaison des testicules des souris sauvages avec ceux des *Ocn*<sup>-/-</sup> et ceux des *Esp*<sup>-/-</sup> montre une diminution de la taille des testicules chez les *Ocn*<sup>-/-</sup> et une augmentation chez les *Esp*<sup>-/-</sup>. Figure 30. La mesure du compte de spermatozoïdes dans ces trois lignées à six semaines, trois mois et six mois montrent une nette diminution chez les souris *Ocn*<sup>-/-</sup> et une nette augmentation chez les souris *Esp*<sup>-/-</sup> par rapport aux souris sauvages. Figure 30.

**Figure 30** : les souris déficientes en ostéocalcine (*Ocn*<sup>-/-</sup>) ont des portées moins fréquentes, des testicules de plus petite taille et un compte de spermatozoïdes diminué par rapport aux souris sauvages. Les souris *Esp*<sup>-/-</sup>, modèle d'ostéocalcine non carboxylée plus importante, ont des testicules plus grands et un compte de spermatozoïdes augmenté. D'après Oury Cell 2011 <sup>1</sup>.



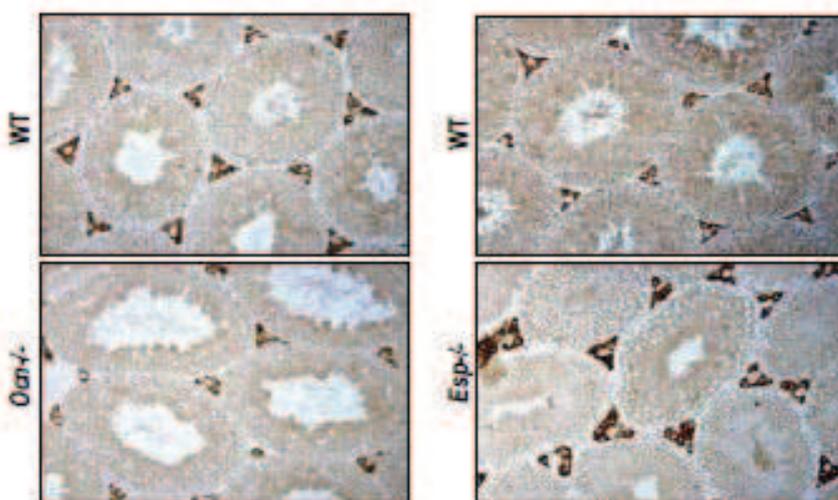
Les coupes histologiques des testicules montrent que l'épaisseur des tubes séminifères est faible chez les souris *Ocn*<sup>-/-</sup> et au contraire nettement augmentée chez les souris *Esp*<sup>-/-</sup>. L'immunohistochimie pour la 3-β-hydroxystéroïde déshydrogénase (3βHSD) qui est un marqueur des cellules de Leydig n'a pas montré de différence de nombre de cellules entre les trois génotypes mais une différence de volume cellulaire entre les cellules de Leydig : *Esp*<sup>-/-</sup> volume augmenté par rapport aux sauvages et *Ocn*<sup>-/-</sup> volume diminué. Figure 31. La quantification des différents types cellulaires présents dans les tubes séminifères montre un nombre de cellules de Sertoli et de spermatogonies normal chez les souris *Ocn*<sup>-/-</sup> par rapport aux sauvages. En revanche il existe une diminution des types cellulaires les plus tardifs de la spermatogenèse à savoir spermatocytes et spermatides. Figure 32. Il est aussi noté une augmentation du nombre de cellules apoptotiques dans les stades tardifs de la spermatogenèse. L'ensemble de cette description histologique des tubes séminifères des souris *Ocn*<sup>-/-</sup> évoque un déficit en testostérone, lequel a été confirmé par les dosages sériques. La testostérone est plus basse chez les souris déficientes en *ostéocalcine* par rapport aux souris sauvages et plus haute chez les souris *Esp*<sup>-/-</sup>. Figure 33.

Pour confirmer l'effet de l'ostéocalcine sur la production de testostérone, une lignée cellulaire TM3 de cellules de Leydig a été traitée avec de l'ostéocalcine recombinante non carboxylée. L'expression dans les cellules de Leydig des gènes nécessaires à la synthèse de la testostérone était augmentée (*StAR*, *Cyp17*, *Cyp11a* et *3βHSD*). Figure 34. De plus, une expérience de co-culture entre des ostéoblastes et des cellules de Leydig a montré une augmentation de la sécrétion de testostérone par les cellules de Leydig, spécifiquement en présence des ostéoblastes. Enfin, génétiquement, la délétion spécifique de l'ostéocalcine dans l'ostéoblaste a retrouvé la même diminution du compte de spermatozoïdes que les cellules globalement déficientes en *ostéocalcine*. En revanche la délétion spécifique de *ostéocalcine* dans les cellules de Leydig n'a pas eu d'effet, soulignant bien que l'ostéocalcine non carboxylée produite par les ostéoblastes dans l'os régule le compte de spermatozoïdes via son action sur les cellules de Leydig et la production de testostérone.

**Figure 31 :**

l'épaisseur des tubes séminifères des souris *Ocn*<sup>-/-</sup> est plus faible que celle des souris sauvages. A l'inverse, les souris *Esp*<sup>-/-</sup> ont une épaisseur augmentée. L'immunomarquage 3βHSD montre des cellules de Leydig de plus faible volume avec moins d'interstitium. D'après Oury Cell 2011

1



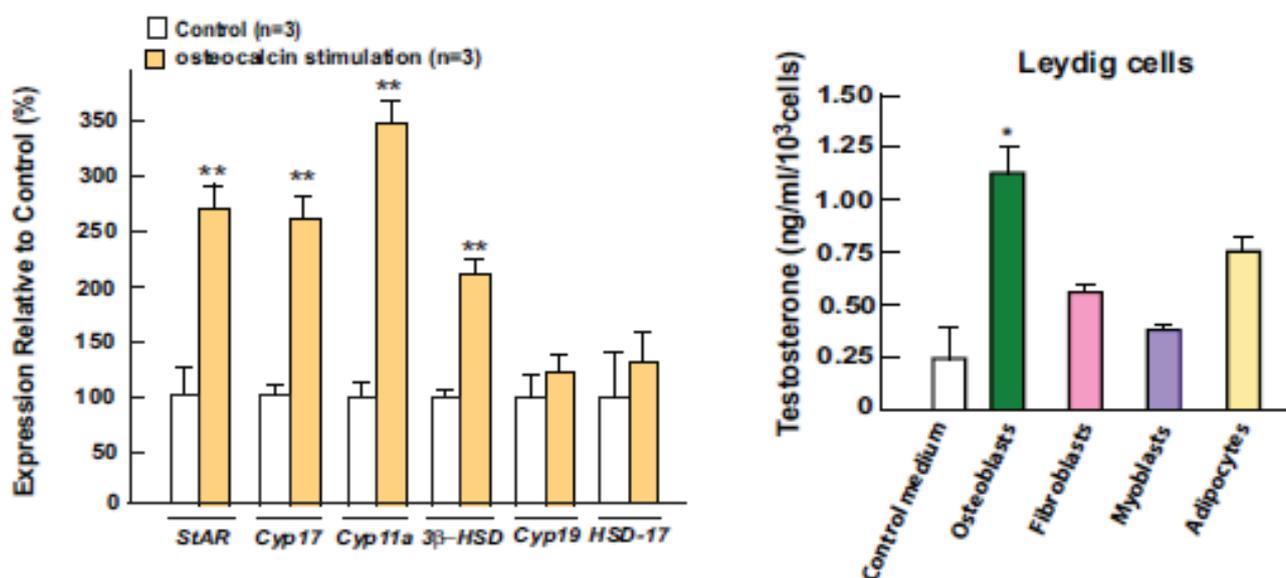
**Figure 32 :** les souris déficientes en ostéocalcine (*Ocn*<sup>-/-</sup>) ont un déficit en stades cellulaires tardifs de la spermatogenèse (spermatocytes II et spermio-genèse). D'après Oury Cell 2011 <sup>1</sup>.

	Number of cells (x10 <sup>5</sup> ) per testis			
	Sertoli cells	Spermato-gonia	Spermato-cytes	Round spermatids
WT (n=5)	3.69 ± 0.27	7.98 ± 1.07	31.1 ± 0.68	44.8 ± 2.21
<i>Ocn</i> <sup>-/-</sup> (n=5)	3.36 ± 0.21	7.39 ± 0.79	24.3 ± 1.72**	30.3 ± 1.50**

**Figure 33 :** les souris déficientes en ostéocalcine (*Ocn*<sup>-/-</sup>) ont une testostérone circulante plus faible alors que chez les souris *Esp*<sup>-/-</sup> elle est augmentée. D'après Oury Cell 2011 <sup>1</sup>.

	Testosterone (ng/mL)		Testosterone (ng/mL)
WT (Breeders) (n=10)	13.60 ± 0.72	WT (Breeders) (n=10)	13.34 ± 1.12
<i>Ocn</i> <sup>-/-</sup> (Breeders) (n=9)	2.70 ± 0.53*	<i>Esp</i> <sup>-/-</sup> (Breeders) (n=9)	23.50 ± 1.77*

**Figure 34 :** le traitement d'une lignée cellulaire TM3 de cellules de Leydig par de l'ostéocalcine recombinante non carboxylée stimule l'expression des gènes nécessaires à la synthèse de la testostérone. La co-culture de cellules de Leydig avec des ostéoblastes induit la sécrétion de testostérone. D'après Oury Cell 2011 <sup>1</sup>.

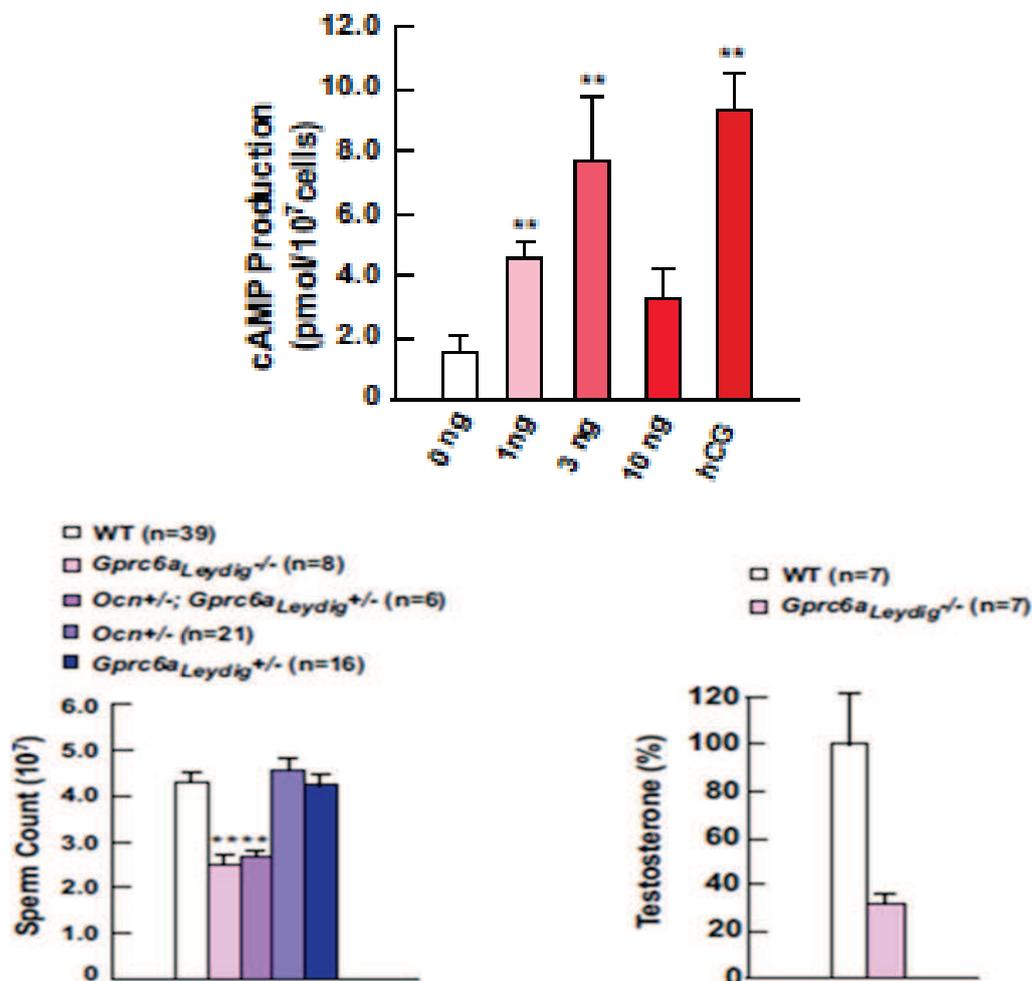


### *L'ostéocalcine agit sur les cellules de Leydig par un récepteur au protéine G orphelin (Gprc6A)*

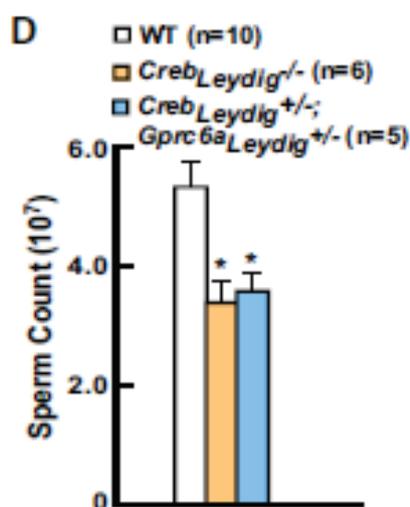
Afin d'identifier les voies de signalisation intracellulaires de l'ostéocalcine sur les cellules de Leydig, des cellules TM3 (lignées de cellules de Leydig) ont été traitées avec de l'ostéocalcine recombinante. En réponse à l'ostéocalcine, il existe dans ces cellules une production d'AMP cyclique mais pas d'activation des autres voies (ERK, phosphorylation de tyrosine, accumulation de calcium intracellulaire). Ce résultat oriente donc vers un récepteur couplé aux protéines G (GPCR). La démarche d'identification de ce GPCR orphelin a utilisé la comparaison de l'expression des *GPCR* entre les ovaires et les testicules. Vingt-deux GPCR orphelins ont ainsi été identifiés dont quatre sont exprimés dans les cellules de Leydig. Parmi ces quatre, *Gprc6a* est particulièrement intéressant puisque les souris déficientes en *Gprc6a* ont déjà été décrites comme ayant à la fois un phénotype métabolique et des troubles de fertilité ce qui est similaire au phénotype observé chez les souris déficientes en ostéocalcine *Ocn*<sup>-/-</sup> 279. Les souris double hétérozygotes (*Gprc6a*<sup>Leydig+/-</sup>, *Ocn*<sup>+/-</sup>) ont reproduit le phénotype des souris déficientes en *Gprc6a*<sup>-/-</sup> spécifiquement dans les cellules de Leydig (*Gprc6a*<sup>Leydig+/-</sup>) permettant de confirmer génétiquement que *Gprc6a* est le récepteur de l'ostéocalcine dans les cellules de Leydig. Figure 35.

Parmi les facteurs de transcription potentiellement régulés par *Gprc6a*, CREB a déjà été décrit comme liant *Cyp1α*, *3βHSD* et *Star* 280. CREB est donc un bon candidat pour médier l'action de l'ostéocalcine/*Gprc6a* dans les cellules de Leydig. L'altération de la fertilité observée chez les souris *Creb*<sup>Leydig+/-</sup> et les souris *Gprc6a*<sup>Leydig+/-</sup> a été retrouvée chez les souris double hétérozygotes (*Creb*<sup>Leydig+/-</sup>; *Gprc6a*<sup>Leydig+/-</sup>) indiquant que CREB est bien le facteur de transcription impliqué dans la voie de signalisation de *Gprc6a*. Figure 36.

**Figure 35** : le traitement par ostéocalcine des cellules de Leydig induit la production d'AMPC. Les souris déficientes dans les cellules de Leydig en récepteur à protéine G (*Gprc6a*<sup>Leydig<sup>-/-</sup></sup>) ont une testostérone basse et un compte de spermatozoïdes diminué. Les souris (*Gprc6*<sup>Leydig<sup>+/-</sup></sup>; *Ocn*<sup>+/-</sup>) ont le même phénotype que les souris *Gprc6a*<sup>Leydig<sup>-/-</sup></sup>. D'après Oury Cell 2011 <sup>1</sup>.



**Figure 36** : les souris déficientes en ostéocalcine (*Ocn*<sup>-/-</sup>) ont une testostérone circulante plus faible. Chez les souris *Esp*<sup>-/-</sup> elle est augmentée. D'après Oury Cell 2011 <sup>1</sup>.



## II- Hypothèse de travail

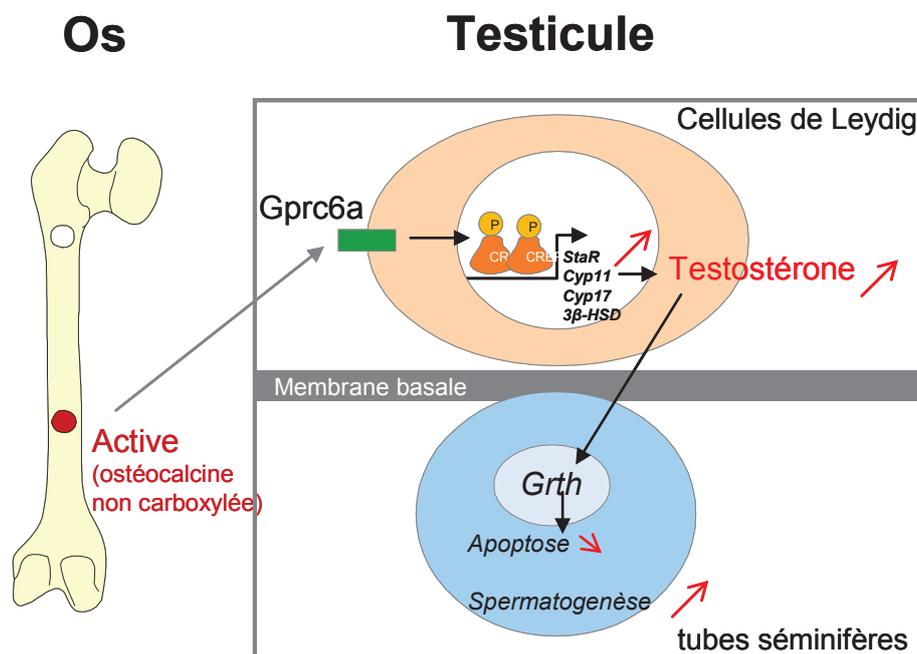
L'étude princeps d'Oury *et al.* a ouvert un champs totalement nouveau d'exploration sur les relations entre l'os et la fertilité. Jusqu'à présent, l'action des hormones sexuelles, notamment des oestrogènes, sur l'os était connue, mais l'action de l'os sur la fertilité n'était pas suspectée. Ces découvertes suggèrent trois questions importantes.

1) Ces nouvelles données observées chez le rongeur sont-elles transposables à l'homme ? Les descriptions cliniques et épidémiologiques de plus en plus nombreuses montrant la relation entre l'ostéocalcine et le métabolisme énergétique laissent penser que cette nouvelle fonction d'ostéocalcine devrait très logiquement être elle aussi conservée chez l'homme. En outre, il n'existe pas pour l'instant d'hormone décrite chez la souris qui ait perdu leur fonction dans l'espèce humaine.

2) Les démonstrations obtenues dans ce premier groupe d'expériences montrent qu'il existe un axe « os-testicule ». Figure 37. Ces animaux avaient un déficit en testostéronémie et une augmentation de leur LH témoignant d'une insuffisance gonadotrope périphérique. La question pour l'instant non résolue est de savoir si l'axe « os-testicule » est dépendant ou indépendant du contrôle hypophysaire de la LH.

3) Enfin dans un contexte de régulation du métabolisme énergétique par l'ostéocalcine, est-il possible d'établir un lien formel entre la régulation du métabolisme énergétique et la fertilité via l'ostéocalcine ?

**Figure 37:** modèle de régulation de la testostérone et de la spermatogénèse par l'ostéocalcine produite par l'os. D'après Oury Cell 2011 <sup>1</sup>.



### III- Résumé

#### 1) Action de l'ostéocalcine sur la fertilité chez l'homme

##### *Critères d'inclusion.*

À partir du trouble de fertilité observé chez les souris déficientes en *ostéocalcine* (*Ocn*<sup>-/-</sup>), nous avons défini un phénotype humain basé sur les critères suivants :

- patients adultes masculins
- présentant des troubles de fertilité depuis au moins 24 mois consécutifs,
- correspondant à une insuffisance gonadique périphérique définie par :
  - une testostérone totale abaissée (<10.4 nmol/L) (méthode RIA réalisée après chromatographie,
  - et une élévation de la LH > 10 UI/L (LH IRMA, Beckman Immunotech®)

##### *Critères d'exclusion.*

Les patients présentant une insuffisance gonadotrope périphérique due à un syndrome de Klinefelter, une microdélétion du chromosome Y et à une hypofertilité secondaire à la chimiothérapie étaient exclus.

##### *Recrutement des patients.*

L'étude a été réalisée en partenariat avec le Dr Ingrid Plotton et le Pr Hervé Lejeune du service de médecine de la reproduction de l'Hôpital Femme-Mère-Enfant au Groupement Hospitalier Est des Hospices Civils de Lyon- France entre 2007 et 2011. Tous les patients ont signé un consentement autorisant les recherches génétiques sur leurs prélèvements. L'ADN des patients était stockée à -80°C dans une banque d'ADN accréditée par l'agence de recherche de biomédecine française (#06-452).

Parmi les 1700 nouveaux patients vus chaque année en consultation, 52 remplissaient les critères d'inclusion de l'étude. L'âge moyen de ces patients était (moyenne ± SD [min-max]) 35.4 ± 2.4 ans [32.2-49.4]. L'ADN de ces patients a été séquencé pour le gène de l'*ostéocalcine* et de son récepteur *GPRC6A*. Un de ces patients présentait une substitution d'une seule paire de base F464Y dans une région hautement conservée de l'exon 4 codante pour un domaine transmembranaire de *GPRC6A*.

##### *Signes cliniques du patient porteur de la mutation F464Y.*

Il s'agit d'un patient de 45 ans d'origine togolaise sans antécédent particulier. Il a consulté pour la première fois en 2006 pour infertilité. Son volume testiculaire était diminué (6 ml à droite, 5 ml à gauche). Son compte de spermatozoïdes montrait une oligospermie sévère avec seulement 2.71 million/éjaculat (normal >20). La vitalité et la mobilité des spermatozoïdes étaient normales. Les tests sélectifs de migration ont montré une faible concentration de spermatozoïdes mobiles (0.13 million/éjaculat).

L'hypogonadisme périphérique était franc avec une testostérone libre basse (1.4 nmol/L; normale entre 2.3-10.7 nmol/L), une LH élevée (12 UI/L ; normale entre 0.5 et 10 UI/L) et une FSH élevée (entre 26.7 et 32.6 UI/l ; normale entre 1.3 et 11.5 UI/l).

Le patient n'avait pas de phénotype osseux particulier en densitométrie (T-score normal) ou en microarchitecture mesurée par HR-pQCT (Scanco®).

En revanche le patient présentait un véritable syndrome métabolique avec quatre des cinq critères diagnostiques <sup>281</sup>: une augmentation de son périmètre abdominal (107cm), une hypertension artérielle traitée, une hypercholestérolémie traitée par rosuvastatine et un diabète découvert à l'occasion de notre étude. Son indice de masse corporelle était élevé à 31.6 Kg/m<sup>2</sup> (NI<25 Kg/m<sup>2</sup>) confirmé par une augmentation de son adiposité mesurée en densitométrie corps entier à 28.1%. Enfin son hémoglobine glycosylée (HbA1c) était à 6.4% (normale <6%).

Nous avons réalisé une hyperglycémie provoquée par voie orale qui montre à 120 mn une glycémie à 11,2 mmol/L confirmant le diabète. Durant ce test on observe clairement une importante sécrétion d'insuline et une importante insulino-résistance en comparaison à un dosage chez un volontaire sain. Figure 38.

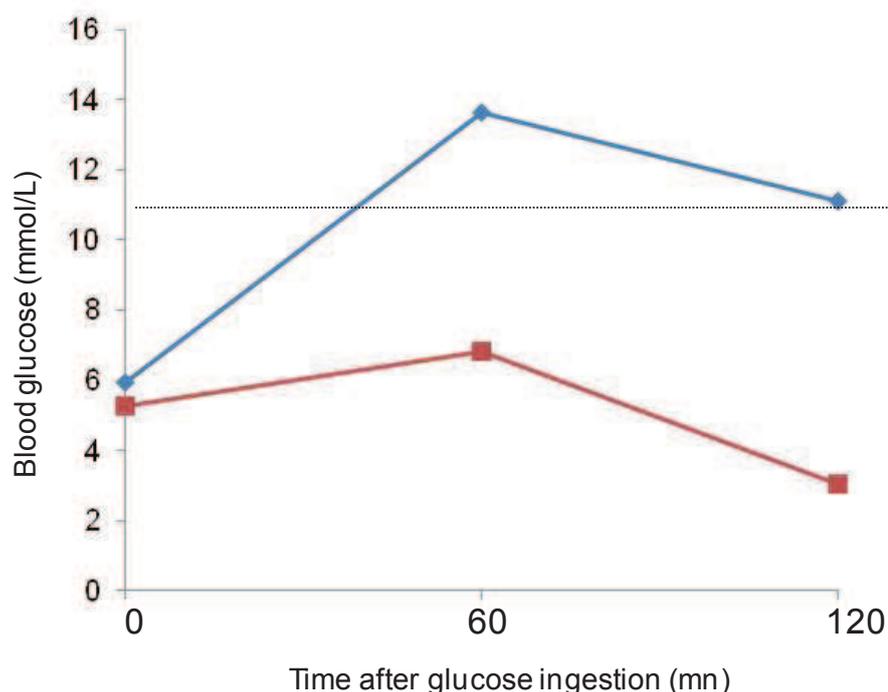
#### *Etude biologique de la mutation F464Y de GPRC6A.*

Les modèles de prédiction informatique suggèrent que F464Y est responsable d'une perte de fonction du récepteur GPRC6A. Biologiquement, in vitro, les cellules HEK293T transfectées avec la mutation montrent que le récepteur n'est plus exprimé à la membrane cellulaire mais reste dans le réticulum endoplasmique. De plus les cellules transfectées ne répondent plus (AMPc) à l'ostéocalcine. Enfin les cellules co-transfectées avec un allèle sauvage et un allèle muté ne répondent pas non plus (AMPc) à l'ostéocalcine suggérant que F464Y serait une mutation dominante négative ce qui a été confirmé en immunomarquage montrant que les deux formes mutée et sauvage restaient dans le réticulum endoplasmique.

Cette étude est la première à identifier chez l'homme une mutation (F464Y) dans la voie de signalisation de l'ostéocalcine et de son récepteur GPRC6A responsable d'un phénotype complet associant une hypofertilité et un syndrome métabolique, sans phénotype osseux apparent.

**Figure 38** : résultats comparatifs de l'hyperglycémie provoquée par voie orale (75g de glucose en 3mn) chez le patient présentant la mutation F464Y de *GPRC6A* (ligne bleue) par rapport à un contrôle sain (ligne rouge). La glycémie supérieure à 11,1 mmol/L affirme le diabète. L'utilisation de l'index HOMA (homeostatic model assessment) montre clairement une insulino-résistance ( $HOMA-R = \text{blood glucose (mmol/L)} \times \text{insuline (mUI/L)} / 22,5$ ) par rapport au volontaire sain.

Le volontaire sain est un homme de 33 ans, sans antécédent médical particulier, avec une vitamine D normale, un indice de masse corporelle de 23 kg/m<sup>2</sup> et une HbA1c mesurée à 5,2%. *Soumis*.



	T0	T1	T2
Blood glucose (mmol/L)	5,96	13,64	11,12
Insuline (mUI/L)	38,8	238,6	739,5
Peptide C (nmol/L)	2,12	5,88	10,55
HOMA-R	10,28	144,64	365,48

— Mutated patient for *GPRC6A*

	T0	T1	T2
Blood glucose (mmol/L)	5,27	6,83	3,05
Insuline (mUI/L)	10,3	82,8	12,4
Peptide C (nmol/L)	0,73	3,3	1,89
HOMA-R	2,41	25,13	1,68

— Healthy volunteer

## 2) L'axe «os-testicule» est indépendant du contrôle hypophysaire de la LH

L'hormone LH est une hormone peptidique hétérodimérique formée de deux sous-unités. La sous-unité  $\alpha$  est commune à plusieurs autres hormones et la sous-unité  $\beta$  est spécifique à la LH. Les souris déficientes en sous-unité  $\beta$  de LH (*Lhb*<sup>-/-</sup>) présentent un hypogonadisme avec de petits testicules, un blocage des cellules de Leydig et une testostérone basse. Le compte de spermatozoïdes est effondré avec un blocage de la spermatogenèse au stade des spermatides. La FSH de ces souris est normale. Le phénotype peut être corrigé par l'administration de HCG indiquant que le déficit est central mais que la réponse testiculaire est normale<sup>282, 283</sup>. Le phénotype est proche de celui observé avec les souris déficientes en ostéocalcine (*Ocn*<sup>-/-</sup>).

Le dosage d'ostéocalcine chez ces souris est élevé. La tentative de traitement par ostéocalcine recombinante par voie sous cutanée n'a pas permis de corriger le phénotype. A l'inverse, le traitement par HCG des souris déficientes en ostéocalcine (*Ocn*<sup>-/-</sup>) a corrigé le phénotype testiculaire et le compte de spermatozoïdes. Les souris sauvages traitées étaient elles avec des valeurs augmentées. Ces données suggèrent que les deux voies LH et ostéocalcine sont indépendantes et que LH ne recrute pas ostéocalcine pour agir sur la spermatogenèse mais que l'ostéocalcine est une voie indépendante potentiellement synergique de régulation de la fertilité qui renseigne sur le niveau du métabolisme énergétique de l'organisme.

## 3) Action de l'insuline sur la fertilité via l'ostéocalcine : vers un axe « pancréas – os – testicule »

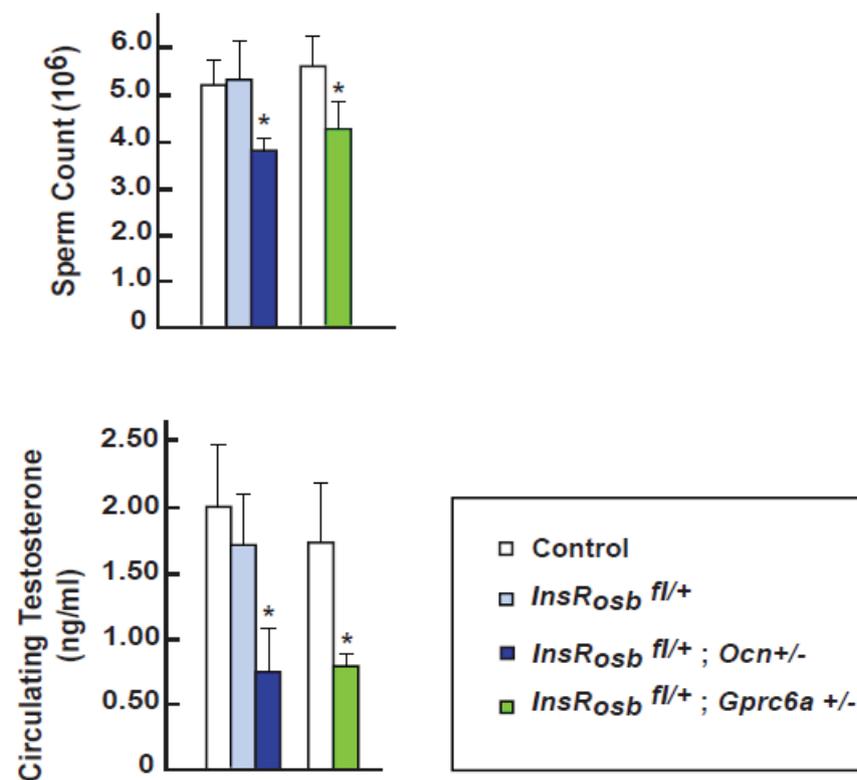
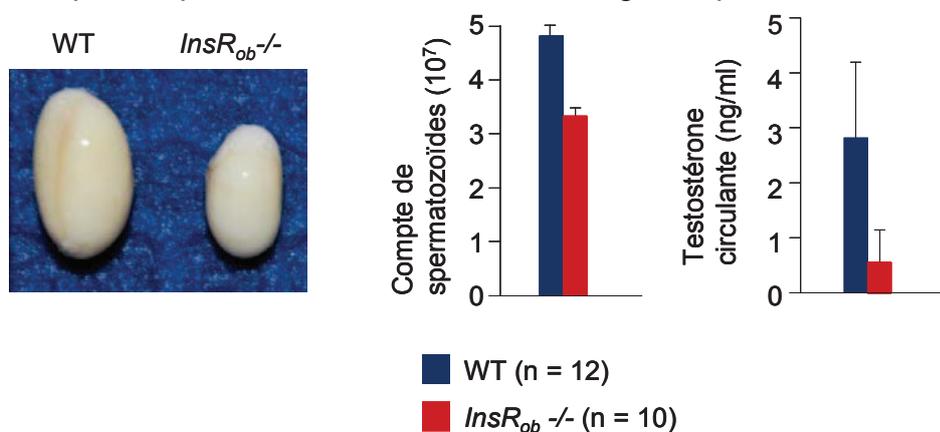
L'indépendance des deux voies LH et ostéocalcine pose la question du mécanisme de régulation en amont de l'ostéocalcine. Précédemment, notre équipe a montré l'importance de la résorption osseuse dans la régulation de la glycémie et du métabolisme énergétique<sup>89</sup>. Ce travail avec celui de l'équipe du Pr Thomas Clemens a démontré qu'en plus de la sécrétion d'ostéocalcine par l'ostéoblaste, le taux d'ostéocalcine active était influencé par la résorption osseuse sous la dépendance de la voie de signalisation de l'insuline dans l'ostéoblaste par l'intermédiaire du ratio RankL/ostéoprotégérine<sup>89, 91</sup>. Cette troisième étape vise à déterminer si l'insuline agit sur la fertilité par l'intermédiaire de l'ostéocalcine.

La destruction sélective des ostéoclastes par l'expression de la toxine diphtérique dans les ostéoclastes après la naissance par une technique de transplantation hépatique des cellules souches hématopoïétiques (sinon les souris *DTA*<sup>fl/fl</sup>, *Cathepsin K Cre* développent une ostéopétrose précoce et meurent dans les 3 semaines après la naissance) a montré un phénotype similaire à celui des souris déficientes en ostéocalcine (*Ocn*<sup>-/-</sup>) avec un hypogonadisme périphérique lié à un déficit en testostérone. A l'inverse, les souris déficientes en *Ostéoprotégérine* (*Opg*<sup>-/-</sup>) ont une résorption augmentée et une ostéocalcine non carboxylée augmentée avec une augmentation de leur testostéronémie et de leur compte de spermatozoïdes. Ces deux modèles de gain et de déficit de fonction impliquent clairement la résorption comme participant à la régulation de la fertilité et du taux de testostérone.

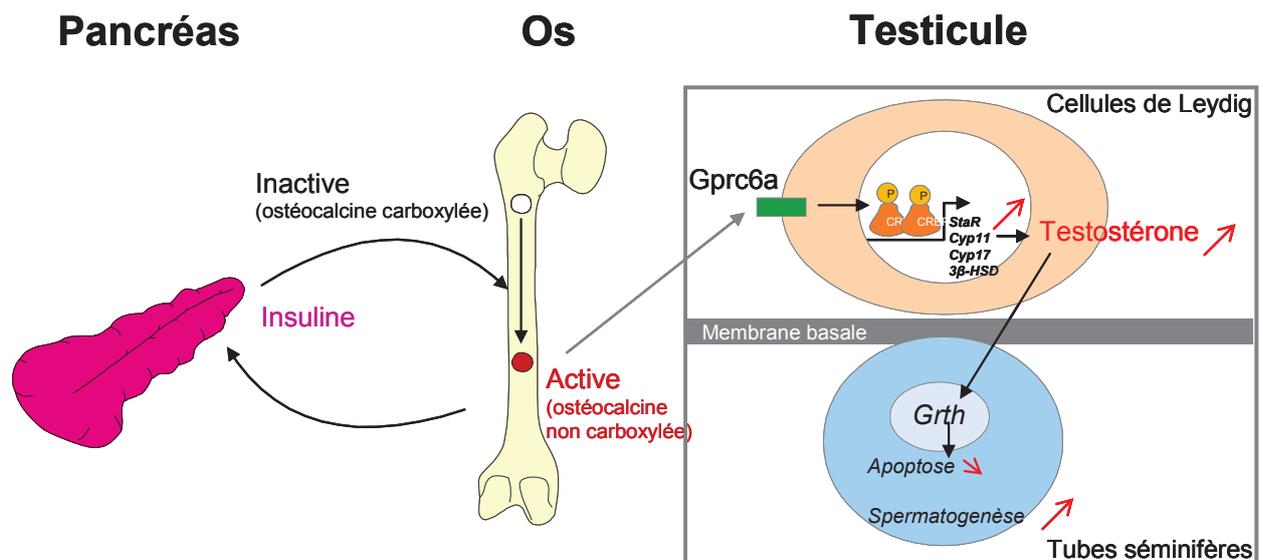
La démonstration du rôle de l'insuline et de la voie de l'ostéocalcine a été apportée génétiquement. Les souris déficientes en récepteur de l'insuline spécifiquement dans les ostéoblastes (*InsR*<sup>ob/-</sup>) ont une diminution du volume de leurs testicules qui s'accompagne d'une diminution de leur compte de spermatozoïdes. Chez ces souris,

le dosage de testostérone circulante est diminué. Les souris hétérozygotes pour *InsR<sup>ob+/-</sup>* comme pour *Ocn<sup>ob+/-</sup>* n'ont pas de phénotype gonadique mais la combinaison des hétérozygotes (*InsR<sup>ob+/-</sup>;Ocn<sup>ob+/-</sup>*) reproduit le phénotype d'hypogonadisme périphérique des homozygotes *InsR<sup>ob-/-</sup>* démontrant que la signalisation de l'insuline dans l'ostéoblaste affecte la fertilité via l'ostéocalcine produite par les ostéoblastes. Des résultats similaires ont été obtenus avec les souris *Gprc6a<sup>leydig+/-</sup>* et les hétérozygotes (*InsR<sup>ob+/-</sup>; Gprc6a<sup>leydig+/-</sup>*). Figure 39 et 40.

**Figure 39** : les souris *InsR<sup>ob-/-</sup>* ont des testicules de petite taille, un compte de spermatozoïdes diminué et une testostérone circulante basse. Les souris (*InsR<sup>ob+/-</sup>;Gprc6a<sup>leydig+/-</sup>*) et (*InsR<sup>ob+/-</sup>;Ocn<sup>+/-</sup>*) reproduisent le phénotype des *InsR<sup>ob-/-</sup>* indiquant que le récepteur de l'insuline des ostéoblastes, l'ostéocalcine et le récepteur Gprc6a sont dans la même voie génétique. *Soumis*.



**Figure 40** : l'axe « pancréas-os-testicule », modèle de régulation de la fertilité par l'ostéocalcine, est indépendant de l'axe hypothalamo-hypophysaire (GnRH-LH).  
*Soumis.*



#### **IV- Article**

### **Evidence for a novel pancreas-bone-testis axis favoring male fertility.**

Oury F, Ferron M, Xu L, **Confavreux CB**, Srinivas P, Lacombe J, Huizhen W, Lugani F, Gharavi A, Lejeune H, Kumar TR, Plotton I, Karsenty G.

*Soumis*

## **Evidence for a novel pancreas-bone-testis axis favoring male fertility**

Franck Oury <sup>1</sup>, Mathieu Ferron <sup>1</sup>, Lin Xu <sup>1</sup>, Cyrille Confavreux <sup>2</sup>, Prashanth Srinivas <sup>1</sup>, Julie Lacombe <sup>3</sup>, Wang Huizhen <sup>4</sup>, Francesca Lugani <sup>5</sup>, Herve Lejeune <sup>6</sup>, T. Rajendra Kumar <sup>4</sup>, Ingrid Plotton <sup>6</sup>, Gerard Karsenty <sup>‡1</sup>

<sup>1</sup>Department of Genetics & Development, Columbia University, New York, NY 10032, USA.

<sup>2</sup>INSERM U1033 - Université de Lyon, Department of Rheumatology, Hôpital Edouard Herriot, Hospices Civils de Lyon, F-69003 Lyon, France.

<sup>3</sup>Department of Cell Biology & Ruth L. and David S. Gottesman Institute for Stem Cell and Regenerative Medicine Research, Albert Einstein College of Medicine, Bronx, NY 10461 USA.

<sup>4</sup>Department of Molecular and Integrative Physiology, University of Kansas Medical Center, Kansas City, Kansas 66160, USA.

<sup>5</sup>Department of Medicine, Columbia University, Russ Berrie Pavilion, New York, NY 10032, USA.

<sup>6</sup>Service de médecine de la reproduction, Hôpital Femme-Mère-Enfant, CHU de Lyon, 59 boulevard Pinel, Bron, France.

<sup>‡</sup>Corresponding Author: email: [gk2172@columbia.edu](mailto:gk2172@columbia.edu)

**CONFAVREUX, Cyrille**

---

**De:** pnas@nas.edu  
**Envoyé:** mercredi 16 novembre 2011 22:07  
**À:** CONFAVREUX, Cyrille  
**Objet:** Receipt of New PNAS MS#2011-18855

November 16, 2011

Title: "Identification of upstream regulators of osteocalcin reproductive function and evidence conservation in humans"

Tracking #: 2011-18855

Author(s):

Franck OURY (Columbia University)

Mathieu Ferron (Columbia University)

Lin XU (Columbia University)

Cyrille CONFAVREUX (Université de Lyon)

Prashanth SRINIVAS (Columbia University)

Julie LACOMBE (Albert Einstein College of Medicine)

Huizhen WANG (University of Kansas Medical Center)

Francesca LUGANI (Columbia University)

Ali GHARAVI (Columbia University)

Herve Lejeune (Service de Médecine de la Reproduction, Hôpital Femme-Mère-Enfant, Bron)

T. Rajendra Kumar (University of Kansas Medical Center)

Ingrid PLOTTON (CHU Lyon)

Gerard KARSENTY (Columbia University)

Dear Dr. CONFAVREUX,

"Identification of upstream regulators of osteocalcin reproductive function and evidence conservation in humans," for which you participated as an author, was submitted by Dr. KARSENTY and received in our office on November 16, 2011. The manuscript has been assigned tracking number 2011-18855.

You may check on the status of your manuscript at any time by clicking the link below and selecting the "Check Status" link. Please also check your name and institutional affiliation in the list at the beginning of this email. If the manuscript is accepted for publication, **this is how your name and institutional affiliation will appear on the published article**. To make any corrections to your contact and affiliation information, please click Manuscript Home to get to your desktop and then click the Modify Profile link to get to your profile page. We encourage you to make these corrections as soon as possible to prevent any possible publication errors. If you have any questions or need help, please contact our office.

[Please view the manuscript](#)

PNAS License to Publish is collected for most manuscripts at initial submission. The summary below reflects our records of the PNAS License to Publish type selected by the submitting author at that time. Please contact us immediately at [PNASAuthorLicense@nas.edu](mailto:PNASAuthorLicense@nas.edu) or 202-334-2679 if this information is incorrect or you have any questions. In the event that your manuscript is withdrawn or not accepted for publication in PNAS, the PNAS License to Publish will be terminated and all rights revert to the author(s).

PNAS License to Publish Summary: PNAS License to Publish conveyed to the National Academy of

**Abstract (171 words)**

The osteoblast-derived hormone osteocalcin favors testosterone biosynthesis in the male mouse following its binding to GPRC6A on Leydig cells of the testis. The unraveling of this regulatory loop for male fertility raises additional questions. A first question is to assess the relevance of these observations to human. Analysis of a cohort of patients with primary testicular failure identified one of them with a point mutation in *GPRC6A* that prevents this receptor to reach the cell membrane and acts as a dominant negative mutation. A second question is to understand the interactions of osteocalcin with the other key hormones involved in male fertility. Here, we demonstrate that osteocalcin does not act downstream of LH to regulate male fertility. We further show that osteocalcin fertility function is determined by energy metabolism through the extent of osteoclastic bone resorption. Indeed insulin signaling in osteoblasts, is able to enhance bone resorption, a process governing osteocalcin bioactivity, and thus favors male fertility in an osteocalcin-dependent manner. This study uncovers a novel pancreas-bone-testis axis allowing integration of energy metabolism balance of the body in the regulation of male fertility. This novel axis acts in parallel to the hypothalamus-pituitary-testis one.

## Introduction

Osteocalcin is an osteoblast-specific secreted protein that, when undercarboxylated, is a multifunctional hormone. It acts on pancreatic  $\beta$  cells to increase insulin secretion, on muscle and fat to promote glucose homeostasis and on Leydig cells of the testis to favor testosterone biosynthesis following its binding to a specific receptor, GPRC6A (1-3). The biological relevance of this latter function is evidenced by the fact that male mice lacking osteocalcin or its receptor specifically in Leydig cells demonstrate a marked reduction of circulating testosterone levels, a decrease in sperm count and mediocre fertility (2).

There is a growing body of evidence that, in humans, serum levels of osteocalcin correlate well with the degree of insulin secretion and insulin sensitivity (4-6). Moreover, recently it was shown that serum osteocalcin levels correlate with serum testosterone levels, at least during growth, in pubertal men (7). However there is, for now, no genetic evidence establishing that osteocalcin fulfills endocrine functions in humans. *Osteocalcin*<sup>-/-</sup> and *Gprc6a*<sup>-/-</sup> mice display oligospermia, low testosterone and high LH (2, 11), i.e. characteristics of a human primary testicular failure. The identification of an

osteocalcin receptor and the realization that osteocalcin influences another function, male fertility, provide an opportunity to address the issue of human genetic evidence by searching for mutations affecting either player of the osteocalcin signaling pathway in a well defined pathological context, namely patients with primary testicular failure of unknown origin.

A remarkable feature of the reproduction phenotype observed in *Osteocalcin*<sup>-/-</sup> mice is that it develops in the face of an increase in circulating levels of luteinizing hormone (LH), a pituitary hormone that is the main regulator of sex steroid synthesis by Leydig cells (8-10). That *Osteocalcin*<sup>-/-</sup> male mice develop their subfertility phenotype in the face of an increase in circulating levels of LH raised the following question: Does osteocalcin act downstream of LH or is there in fact two different pathways both necessary for male fertility, one pituitary-dependent and one bone-dependent? If the later case was to be true one of them needs to decipher how the reproductive function of osteocalcin is regulated.

This study was designed to address these two questions. We show here that a male patient consulting for infertility with peripheral hypogonadism but high LH level

harbors an amino acid substitution in GPRC6A that not only prevents this receptor to reach the cell membrane but also acts as a dominant negative mutation. Additionally, we provide evidence based on cell-specific gene deletion experiments in the mouse that there is a pancreas-bone-testis axis favoring male fertility that acts in parallel to the hypothalamus-pituitary-testis one. Taken together these results provide, on genetic ground, further evidence in favor of a co-regulation of bone mass and reproduction in bony vertebrates.

## Results

### Evidence for a conservation of the reproductive function of osteocalcin in human

The notion that skeleton could regulate male fertility is sufficiently novel to raise the legitimate question as to know whether this regulation occurs also in humans. To address this question we relied on the specific phenotypic features of the *Osteocalcin*<sup>-/-</sup> mice. Out of the 1700 new patients seen in outpatient clinics, 52 filled inclusion criteria of the study (12-14). These 52 patients, were aged (mean  $\pm$  SD [min-max]) 35.4 $\pm$ 2.4 years [32.2-49.4]. For these patients, we sequenced all exons of *Osteocalcin* and *GPRC6A*, the receptor mediating osteocalcin reproductive function in Leydig cells. Among the included patients, one of them presented a F464Y substitution resulting from a single base-pair substitution in a highly conserved region of exon 4 of *GPRC6A* (Figure 1A and Figure S1). This exon encodes one of the transmembrane domains of GPRC6A.

The mutated patient was a 45-year-old man originating from Togo, with no medical records. He consulted in 2006 for infertility. Testicular volume was decreased at 6 ml for the right side and 5 ml for the left. Semen analysis showed an extreme

oligospermia with 2.71 million/ejaculation (normal >20), with normal vitality was normal with 6% necrospermia, the mobility of the spermatozoa was observed for 59.65%. The migration after selective procedure showed low concentration of motile spermatozoa 0.13 million/ejaculation. Low free testosterone (1.4 nmol/L; normal range= 2.3-10.7 nmol/L) and elevated LH (12 UI/L; normal range= 0.5-10 UI/L) confirmed peripheral hypogonadism. FSH levels were confirmed elevated between 26.7-32.6 UI/l (normal range= 1.3-11.5 UI/l) and inhibin B decreased (<15ng/l). Interestingly, this patient had no bone mass phenotype (normal T-score) and normal microarchitecture assessed by HR-pQCT (Scanco®) but presented a true metabolic syndrome with 4 out of 5 diagnosis criteria (Alberti Circulation 2009 p 1640): an elevated abdominal perimeter (107cm), a treated high blood pressure, a dyslipidemia treated by Rosuvastatine and a diabetes. His body mass index was elevated at 31.6 Kg/m<sup>2</sup> (NI<25 Kg/m<sup>2</sup>) and associated to an increased adiposity at 28.1% assessed in whole body densitometry. Glycohemoglobine A1c was assessed at 6.4% (normal <6%). Results of his oral glucose tolerance test (OGTT) in comparison to a healthy volunteer clearly reflects his high insulin secretion and peripheral insulin resistance. (see table 1 and 2). The similarity between this clinical

presentation and the phenotype of mice lacking osteocalcin signalling (1, 2, 11) prompted us to study this missense mutation in greater details.

Several lines of evidence indicate that this substitution results in a loss of function of GPRC6A. First, immunofluorescence of HEK293T cells transfected with either a wild type (WT) or a F464Y mutated MYC-tagged version of GPRC6A showed that this mutation prevents localization of the receptor to the cell membrane, which instead accumulates in the endoplasmic reticulum (Figure 1B). Second, to analyze the effect of this GPRC6A missense mutation on its response to osteocalcin, we measured cAMP production in transfected HEK293T cells after stimulation by osteocalcin. While osteocalcin increased cAMP production 3.4 folds in HEK293T cells transfected with the WT form of GPRC6A, it failed to do so in cells transfected with the F464Y mutated form of GPRC6A (Figure 1C). Third, that osteocalcin also failed to increase cAMP production in cells co-transfected with both WT and F464Y mutated forms of GPRC6A indicated that this mutation acts as a dominant negative one. To ascertain that this was not due to unequal amounts of the transfected proteins, we performed western-blot and observed that approximately equal amount of WT and F464Y mutated form of GPRC6A were

present in HEK293T cells transfected with both cDNAs (Figure S2). To visualize that this is a dominant negative mutation, we performed immunostaining in transfected HEK293T cells. As shown in Figure 1D, the WT form of the receptor never reached the cell membrane when it was co-transfected with the mutated form of the receptor. Instead it remained localized with the mutated one around the nucleus of the co-transfected cells. Taken together, these data are consistent with the hypothesis that the F464Y substitution of GPRC6A could be the cause of the subfertility symptoms observed in this patient.

### **Osteocalcin and LH define two different modes of regulating male fertility**

In view of the evidence presented above it became even more relevant to determine whether osteocalcin belongs to a known or to a novel pathway favoring male fertility. This question is pertinent not only because of the reproductive phenotype of the *Osteocalcin*<sup>-/-</sup> mice but because the main endocrine pathway regulating male fertility is the hypothalamus-pituitary-testis pathway. The pituitary hormone regulating testosterone biosynthesis is Luteinizing hormone (LH), a heterodimer between an  $\alpha$ -subunit common to several peptide hormones and a  $\beta$ -subunit that is specific of LH (8, 9, 15, 16).

Although less severe, the reproductive phenotype of *Osteocalcin*<sup>-/-</sup> male mice bears resemblance to the one seen in *Lhb*<sup>-/-</sup> male mice as they are both characterized by a defect in testosterone synthesis and testosterone-dependent events (2, 3). That LH circulating levels are high in *Osteocalcin*<sup>-/-</sup> male mice raises the prospect that osteocalcin reproductive function may be in fact regulated by LH. If it was the case one would expect that circulating levels of the undercarboxylated (active) form of osteocalcin should be low in *Lhb*<sup>-/-</sup> male mice and that injections of osteocalcin would rescue, at least in part, the hypotestosteronemia of *Lhb*<sup>-/-</sup> male mice.

Instead, circulating levels of undercarboxylated osteocalcin were higher in *Lhb*<sup>-/-</sup> than in WT male mice (Figure 2A). This may represent a futile attempt to promote testosterone production in the face of an absence of LH. Moreover, daily injections of osteocalcin for one month in 6 week-old *Lhb*<sup>-/-</sup> male mice did not normalize their low circulating testosterone levels (Figure 2B). Accordingly, histological analysis of testes of 10 week-old *Lhb*<sup>-/-</sup> male mice injected with osteocalcin failed to show any improvement in spermatogenesis or reversal of their Leydig cells hypoplasia (Figure 2C-D and Figure S3A). The dose of osteocalcin used in this experiment was chosen because it has been

shown to be sufficient to increase insulin and adiponectin, two other hormones whose expression is regulated by osteocalcin (1, 17). More importantly, this dose was also shown to affect testosterone synthesis by Leydig cells in culture (2). Immunofluorescence analysis of mature Leydig cells, using anti-Cyp17, anti-3 $\beta$ -HSD or anti-Cyp11a antibodies, showed that daily injections of osteocalcin for 30 days did not increase the number of Leydig cells in *Lhb*<sup>-/-</sup> male mice, as hCG (Human Chorionic gonadotropin) injections, the placental homologue of LH, did (Figure 2E). Likewise, and unlike what could be achieved by hCG injections, there was no increase in testis size and weight (Figure 2F-G), and there was virtually no sperm in *Lhb*<sup>-/-</sup> male mice following osteocalcin injections. The absence of any rescue of the reproductive defect in *Lhb*<sup>-/-</sup> male mice following injections with osteocalcin was not due to a poor bioactivity of recombinant osteocalcin since treatment of TM3 Leydig cells with the same preparation of protein showed a significant increase in cAMP production (Figure S3B). These results implied that osteocalcin regulates male fertility independently of the known endocrine pathway favoring this function.

In view of the importance of this concept and to further dissociate LH-dependent from osteocalcin-dependent regulation of male fertility, we injected 6-week-old *Osteocalcin*<sup>-/-</sup> male mice with hCG (5UI, twice a week) for one month, reasoning that, if osteocalcin were a mediator of LH reproductive function, these injections would not improve the reproductive abnormalities seen in *Osteocalcin*<sup>-/-</sup> mice. In contrast, this treatment normalized all parameters analyzed: testis weight, epididymides and seminal vesicle weights, sperm count and testosterone circulating levels in *Osteocalcin*<sup>-/-</sup> male mice without affecting osteocalcin circulating levels (data not shown). These data indicate that LH does not recruit osteocalcin to promote testosterone biosynthesis (Figure 3). Taken together, results of these two experiments rule out a model whereby osteocalcin is a mediator of LH regulation of male fertility. They rather suggest that osteocalcin and LH act in two distinct pathways regulating male fertility.

### **Bone resorption as a determinant of osteocalcin reproductive function**

The experiments presented above clearly dissociated the pituitary-dependent from the bone-dependent regulation of male fertility. As a result they beg the question of the

identity of upstream regulator of osteocalcin reproductive function. We have previously shown that the ability of osteocalcin to favor glucose homeostasis is determined by osteoblastic bone resorption (18). This prompted us to ask whether male fertility was another physiological function of osteocalcin determined by bone resorption. To address this question we relied on two mouse models, one of loss of function and one of gain of function.

First, we generated a mouse model harboring a severe depletion of osteoclasts by crossing *Ctsk-Cre* mice, in which the Cre recombinase is expressed in mature osteoclasts only (19), with *DTA<sup>fl/+</sup>* mice that express a flox-stop-flox diptheria toxin subunit alpha gene (DTA) cassette under the control of the Rosa26 locus (20). *DTA<sup>fl/+</sup>* mice are phenotypically wild type (WT) because the flox-stop-flox cassette present in front of the *DTA* gene prevents expression of the DTA protein in any tissues. Cre-mediated removal of the stop cassette, in osteoclasts only, in these mice leads to expression of DTA, a toxic protein, and osteoclast death (Figure 4A).

*Ctsk-Cre;DTA<sup>fl/+</sup>* mice developed a classical osteopetrosis phenotype characterized by very dense bone on X-ray and absence of incisors eruption because of a severe impairment in bone resorption (Figure S4). All mutant animals died between 2 and 3 weeks of age. To circumvent this postnatal lethality, we transplanted *Ctsk-Cre;DTA<sup>fl/+</sup>* fetal liver hematopoietic stem cells (HSC) into WT irradiated adult mice; since osteoclasts are of hematopoietic origin, mice transplanted with *Ctsk-Cre;DTA<sup>fl/+</sup>* HSC should be depleted of osteoclasts. Four months post-transplantation the bone and fertility phenotypes of these animals were analyzed.

Bone histomorphometry verified that *Ctsk-Cre;DTA<sup>fl/+</sup>* transplanted mice developed a high bone mass phenotype due to a 15-fold decrease in the number of osteoclasts (Figure 3B-C). The presence of cartilage remnants achieved to characterize this osteopetrosis phenotype (Figure 4D). These osteoporotic mice showed more than a 2-fold decrease in the undercarboxylated (GLU13) form of osteocalcin (Figure 4E). This is more severe than what is seen in *Osteocalcin<sup>+/-</sup>* mice (18). These data established that *Ctsk-Cre;DTA<sup>fl/+</sup>* transplanted mice had poor bone resorption and, consequently, a

marked decrease in the active form of osteocalcin as seen in osteopetrotic patients (18).

*Ctsk-Cre;DTA<sup>fl/+</sup>* transplanted mice demonstrated also a significant reduction of sperm count and testosterone circulating levels (Figure 4F-G). Testes, epididymides and seminal vesicle weights were also reduced in *Ctsk-Cre;DTA<sup>fl/+</sup>* mice (Figure S5). Moreover, gene expression analysis performed in testes showed that expression of the genes encoding the major enzymes required for testosterone biosynthesis (*Star*, *Cyp11a*, *Cyp17*, *3 $\beta$ -HSD*) was decreased in *Ctsk-Cre;DTA<sup>fl/+</sup>* male mice while expression of *HSD-17* and *Cyp19a* was not (Figure 4H). These phenotypic and molecular abnormalities mimic what is seen in *Osteocalcin*<sup>-/-</sup> male mice (2). These results suggest that osteoclastic bone resorption regulates positively male fertility by increasing osteocalcin bioactivity.

Next, to further support this data we looked at a mouse model of an increase in osteoclast number. The model we choose here are mice lacking *Osteoprotegerin* (*Opg*), a decoy receptor inhibiting the function of the osteoclast differentiation factor RankL. It has been shown before that *Opg*<sup>-/-</sup> mice are osteoporotic because of a vast increase in the number of osteoclasts (21). Hence they allow us to ask in a more selective manner the

contribution of bone resorption to male fertility. There was in *Opg*<sup>-/-</sup> mice a massive increase in the undercarboxylated (GLU13) form of osteocalcin (Figure 5A). Testes, epididymides and seminal vesicle were all increase in *Opg*<sup>-/-</sup> mice (Figure 5B-D). Likewise, sperm count and circulating testosterone levels were significantly increased in *Opg*<sup>-/-</sup> mice (Figure 5E-F). Taken together, the results gathered from the analysis of models of loss- and gain-of-function of bone resorption concur to indicate that bone resorption is a physiological regulator of male fertility.

### **Insulin signaling in osteoblasts favors testosterone biosynthesis**

The cardinal role of bone resorption in the regulation of male fertility provided a handle to look for upstream regulators of osteocalcin reproductive function. In particular, since it is a positive regulator of bone resorption we considered the possibility that insulin signaling in osteoblasts might influence testosterone biosynthesis in an osteocalcin-dependent manner.

To address this question we generated and analyzed twelve week-old male mice lacking selectively the gene encoding for insulin receptor in osteoblasts (*InsR<sub>osb</sub>*<sup>-/-</sup>).

These animals demonstrated a decrease in testis size and weight, in epididymides and seminal vesicle weights as well as a reduced sperm count (Figure 6A-E). Circulating testosterone levels were decreased in *InsR<sub>osb</sub>*<sup>-/-</sup> male mice (Figure 6F-G). Moreover, and as it is the case in *Osteocalcin*<sup>-/-</sup> male mice, gene expression analysis showed that expression of *StAR*, *Cyp11a*, *Cyp17*, *3β-HSD* was decreased in *InsR<sub>osb</sub>*<sup>-/-</sup> testes while the one of *HSD-17* and *Cyp19a* was not (Figure 4H). Thus the phenotypic, biochemical, and molecular abnormalities of *InsR<sub>osb</sub>*<sup>-/-</sup> male mice are indistinguishable from those of *Osteocalcin*<sup>-/-</sup> male mice (2).

To establish genetically a link between insulin signaling in osteoblasts and male fertility, in an osteocalcin-dependent manner, we generated compound mutant mice lacking one allele of *InsR* in osteoblasts and one allele of either *Osteocalcin* or one allele of *Gprc6a*. As shown in Figure 7, whether we looked at testis, epididymides, seminal vesicle weights, sperm count and circulating levels of testosterone, these compound mutant mice demonstrated abnormalities that were similar to those seen in *InsR<sub>osb</sub>*<sup>-/-</sup>, *Osteocalcin*<sup>-/-</sup> or even more relevant in *Gprc6a*<sup>-/-</sup> mice (2, 11). Altogether these results

uncover a previously unappreciated pancreas-bone-testis axis in the control of male fertility that acts in parallel to the classical hypothalamus-pituitary-testis axis (Figure 7F).

## Discussion

A question that has plagued osteocalcin research since this molecule was recognized to be a hormone in rodents has been to verify, on genetic ground, its endocrine nature in humans. Although there is no example yet of a protein being a hormone in the mouse that would have lost abruptly this characteristic in humans, this was a legitimate question to ask given the unexpected site of synthesis of osteocalcin and its spectrum of functions.

To date we have not identified patients with homozygous mutation causing a loss-of-function in the *Osteocalcin* gene. In contrast, when analyzing patients with peripheral testicular insufficiency we noted that one of them was heterozygous for a point mutation in exon 4 of *GPRC6A*. This missense mutation occurring in one of the transmembrane regions of the molecule prevented its localization to the cell membrane. Ex vivo, three different assays indicated that this mutation acts in a dominant negative manner. Hence, these results suggest that *GPRC6A* is a new susceptibility locus for peripheral testicular insufficiency in humans. Since the sequencing was restricted to exons we cannot exclude that mutations in regulatory regions of either *Osteocalcin* or *GPRC6A* may be present in

other patients. Results of this first analysis should be viewed as a stepping-stone to perform a more systematic analysis in a larger patients population with primary testicular failure as well as in patients with glucose intolerance or metabolic syndrome.

Leydig cells of the testis are responsible for producing testosterone, which in turns determines development of male reproductive organs, maturation of germinal cells and generation of estrogen by aromatization. By and large the main physiological regulator of testosterone production by Leydig cells is the pituitary hormone LH (9, 22). Accordingly, male mice lacking LH or its receptor are sterile with low levels of circulating testosterone. Given this knowledge it was unexpected that another hormone would be needed for testosterone biosynthesis and that this hormone, osteocalcin, was made in bone. Yet, the fact that *Osteocalcin*<sup>-/-</sup> male mice are subfertile with a marked decrease in circulating testosterone and low sperm count established the biological relevance of this regulation at least in the mouse (2).

The fact that osteocalcin cannot rescue the sterility of *Lhb*<sup>-/-</sup> male mice along with the complete rescue of the subfertility of *Osteocalcin*<sup>-/-</sup> male mice after hCG injections are not consistent with a model in which osteocalcin would be a mediator of

LH in the male mouse. Yet, hCG was more active in WT than in *Osteocalcin*<sup>-/-</sup> mice suggesting that osteocalcin may act synergistically with LH. These results are more consistent with the existence of a second axis including osteocalcin and favoring male fertility.

We show here that bone resorption by osteoclasts through its ability to decarboxylate osteocalcin favors male fertility, and that this function is enhanced by insulin signaling in osteoblasts. These results do not exclude, as shown before, that insulin acts through other pathways to favor fertility (23-27). They support, however, the emerging notion that bone is an endocrine hub on which other hormones such as insulin or leptin signal to recruit osteocalcin in order to fulfill some of their functions (18, 28). By extension one can predict that other endocrine or neuronal regulators of bone resorption such as the parathyroid hormone or the sympathetic nervous system may also affect male fertility (28, 29). It remains to be determined however, provided that these regulations exist, whether they occur through osteocalcin.

## Materials and Methods

### Mouse models

Generation of *Lhb*<sup>-/-</sup>, *Ocn*<sup>-/-</sup>, *Gprc6a*<sup>-/-</sup>, *Opg*<sup>-/-</sup> and *InsR<sub>osb</sub>*<sup>-/-</sup> mice was reported previously (2, 8, 18, 21, 30). *CtskCre;DTA<sup>fl/+</sup>* mice were generated by intercrossing *Ctsk<sup>Cre/+</sup>* mice which express the Cre recombinase under the control of the osteoclast specific *Cathepsin K* locus (12), with the *DTA<sup>fl/+</sup>* mice, which harbor a flox-STOP-flox-diphtheria toxin subunit alpha (*DTA*) gene cassette under the control of the *Rosa26* promoter (21). CD45.2<sup>+</sup> fetal liver stem cells isolated from E14.5 control (*Ctsk<sup>Cre/+</sup>* and *DTA<sup>fl/+</sup>*) or *CtskCre;DTA* embryos were transplanted (2 x 10<sup>6</sup>/mice) via tail vein injection into 5-week-old CD45.1<sup>+</sup>-irradiated WT recipient mice. Mice genotypes were determined by PCR; primer sequences are available upon request.

### Osteocalcin and hCG treatments

6 week-old mice were treated by i.p. injections for one month with hCG (5 U twice a week) or with recombinant osteocalcin (3 ng/g daily) (1) for 1 month.

### **Human studies**

Based on osteocalcin deficient mice phenotype, we targeted a human phenotype based on the following inclusion criteria: absence of fertility of more than 24 consecutive months, an elevated LH over 10 UI/L (LH IRMA, Beckman Immunotech) and a low serum testosterone level (<10.4 nmol/L) (RIA method performed after chromatography).

Patients with hypofertility due to Klinefelter syndrome, Y chromosome microdeletion and hypofertility secondary to chemotherapy were excluded.

Patients were recruited in the “Reproductive and Fertility Center Care” of the Women-Mother-Baby Hospital, Hospices Civils de Lyon, France between 2007 and 2011. All patients signed a consent form authorizing genetic research. Patient DNA were stored at -80°C in the DNA bank approved by the National French Biomedicine Agency under accreditation number 06-452 and local ethic comity.

### **Mutation screening**

Using standard protocols, DNA was preferentially extracted from peripheral blood.

Reference sequences of *Osteocalcin* and *GPRC6A* were downloaded from the National

Center for Biotechnology Information (NCBI) database (37.1 Build; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) and the Ensembl genome browser (<http://uswest.ensembl.org/index.html>). Primers were designed for the 4 exons of human osteocalcin and the 6 coding exons of human *GPRC6A*. DNA from each sample was amplified using Platinum PCR SuperMix High Fidelity amplification kit (Invitrogen, Carlsbad, CA). Amplified PCR products were subjected to Sanger sequencing (Genewiz, NJ). Sequence analysis was performed using Sequencer 4.8 software. All putative variants were confirmed by bidirectional sequencing.

### **Sperm Counts and Hormone Measurements**

Caudal epididymides were minced in 1 ml PBS 1X, the number of cells released counted after 1 hr. The total sperm count was assessed in the final suspension by using a hemocytometer (31). Circulating levels of testosterone were measured by radioimmunoassay (RIA) from Diagnostic Systems Laboratories. Serum levels of carboxylated, undercarboxylated and total osteocalcin were measured using a triple ELISA assay described previously (17).

## **Histology**

For immunofluorescence experiments, testes were embedded in optimal cutting temperature compound (Sakura Finetek) and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  before the preparation of 3 mm sections. Sections were fixed for 30 min in PBS 1X/PFA 4% at room temperature and overnight in PBS 1X/PFA 1% at  $4^{\circ}\text{C}$ . Sections were labeled with primary antibodies against  $3\beta$ -HSD, CYP17A (Santa Cruz Biotechnology) and CYP11A, 25 and subsequently probed with secondary Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-rabbit (Molecular probes).

## **Gene Expression Studies**

RNA was purified from testis using TRIZOL (Invitrogen). RNA isolation, cDNA preparation, and qPCR analysis was carried out following standard protocols. qPCR analyses were performed using specific quantitative PCR primers from SABiosciences (<http://www.sabiosciences.com/RT2PCR.php>).

### **Evaluation of rare variants**

All variants were evaluated for potential pathogenicity using four methodologies. First, public databases (dbSNP, 1000 genomes [<http://browser.1000genomes.org/index.html>]) were consulted to determine if the variants had previously been detected in reference populations. Coding variants not present in public databases were further cross-referenced with prior publications and mutation databases, such as the Human Gene Mutation Database (HGMD). Novel missense variants were evaluated for conservation among species using TCOFFEE and for pathogenic potential using standard prediction programs (i.e., PolyPhen, SIFT, PhD-SNP). Novel synonymous and non-coding variants were evaluated for conservation among other mammalian species (bl2seq feature); novel synonymous variants were also evaluated for potential aberrant splicing (Human Splice Finder and ESE Finder). The frequencies of selected new variants were determined in healthy controls (at least 296 controls) by direct sequencing.

### **GPRC6A Mutagenesis**

The normal GPRC6A-c-myc tagged vector was constructed according to (32). The T->A site directed mutagenesis was performed using Agilent (USA) mutagenesis kit using the following Forward primer 5'-AAGGATTCATTTCACTATGA TGCCCACGGGGA-3' and the Reverse primer 5'-TCCCCGTGGGCATCATAGTGA AATG AAT TCCTT-3'.

### **GPRC6A construction**

To construct a flag-tagged GPRC6A constructs, the c-myc tagged Gprc6a plasmids were amplified with the following primers: NotI 5' AGCGCGGCCGCGTCGTGGCTA TCACTTCTTCCTG; BamHI 3' CGGGATCCTCATATACTTGAAGTTCTTTTCTGAC G. The amplified fragment was digested with NotI and BamHI and subcloned into p3XFLAG-CMV vector.

### **Cell culture, transfection and immunofluorescence assay**

HEK293T cells were cultured  $1.5 \times 10^5$ /well on coverslips coated with Poly-D-Lysine in DMEM high glucose medium complemented with 10% fetal bovine serum and 1%

penicillin/streptomycin (Sigma) at 37C in a humidified atmosphere at 5% CO<sub>2</sub> overnight.

Cells were then transfected with 500 ng of WT GPRC6A-pcDNA or mutant GPRC6A-pcDNA using the Polyplus jetPRIME reagent according to the manufacturer's instructions. The eGFP-N1 plasmid was used as a control for transfection efficiency. The immunofluorescence assays were performed 12 hrs after transfection. Cells were washed 3 times with PBS, fixed for 10 min in 4% paraformaldehyde at room temperature, permeabilized with or without 0.01% TritonX-100 and then incubated with Myc-Tag rabbit mAb (1:200, Cell Signaling), anti-alpha 1 sodium potassium ATPase antibody (1:500, Abcam) or monoclonal anti-FLAG M2 (1:500, Sigma). After 24h at 4C, cells were rinsed with PBS and incubated with Alexa Fluo 488 goat anti-rabbit (1:1000) or/and Alexa fluo 555 donkey anti-mouse for 2hr at room temperature. All slides were then mounted with fluoro-gel II with DAPI (Electron Microscopy Sciences). Staining was visualized and captured using a Zeiss fluorescent microscope or Nikon confocal microscope.

### **cAMP measurement**

For cAMP measurement, HEK293T cells were transfected with myc-pcDNA3, GPRC6A-pcDNA3, GPRC6A mutant-pcDNA3, and co-transfected with both of GPRC6A and its mutant in 6 cm dishes. Cells were starved for 16 hr (in the presence of 0.1% BSA) and then pre-incubated in the presence of 0.5mM IBMX for 30 min and stimulated with 3 ng/ml of osteocalcin also in the presence of 0.5mM IBMX for 30 min. cAMP concentration was measured with the Parameter cAMP kit (R&D Systems, KGE002).

### **Acknowledgment**

We thank Dr. P. Ducy for critical reading of the manuscript. Dr. S. Kato for generously providing the *Ctsk-Cre* mice. Drs. A.N. Economides and S. Kousteni for generously providing us the *DTA<sup>fl/+</sup>* mice. Dr. E. Clark for generously providing the *Opg<sup>-/-</sup>* mice. Drs. Pr Yves Morel and Raymond Barruet for collecting patients DNA. This work was supported from the NIH (G.K., R.T.K, A.G.), Canadian diabetes association (M.F.) and Human frontier scientific program (F.O.).

## Figure legends

### Figure 1

#### Identification of an amino acid substitution of GPRC6A associated with decreased fertility in humans

(A) Chromatogram of T->A missense mutation in the *GPRC6A* gene seen in heterozygous form in the patient. (B) Immunofluorescence of HEK293 cells transfected with the WT (GPRC6A-MYC) or mutated (GPRC6A-MYC-F464Y) form of GPRC6A. Nuclei are stained with DAPI (blue). The MYC-tag was stained using a Alex Fluo 488 secondary antibody (Green) and the membrane marker alpha 1 sodium potassium ATPase was stained using Alex fluo 555 (Red). (C) cAMP production upon 3 ng/ml osteocalcin stimulation is increased (>3 folds) in HEK293T cells transfected with WT form of GPRC6A (GPRC6A-pcDNA3) versus control (MYC-pcDNA3). HEK293T cells transfected with the mutated form of GPRC6A (GPRC6A mutant-pcDNA3) or co-transfection with both WT and mutated form failed to respond to osteocalcin stimulation. (D) Immunofluorescence of HEK293T cells co-transfected with the WT (GPRC6A-

FLAG) or mutated (GPRC6A-MYC-F464Y) form of GPRC6A. The FLAG-tag was stained using a Alex fluo 555 secondary antibody (Red) and MYC-tag with Alex fluo 488 secondary antibody (Green). Nuclei are stained with DAPI (blue).

## Figure 2

### **Analysis of the rescue of male fertility phenotype in *Lhb*<sup>-/-</sup> male mice after osteocalcin injections**

(A) Measurement of uncarboxylated (GLU-OCN), carboxylated (GLA13-OCN), total (Total-OCN) and undercarboxylated (GLU13-OCN) forms of osteocalcin in serum of 10 week-old *Lh*-deficient mice (*Lhb*<sup>-/-</sup>) (n=7) versus WT (n=5). (B) Circulating testosterone levels in 12 week-old WT (n=5) and *Lhb*<sup>-/-</sup> (n=7) mice, and in *Lhb*<sup>-/-</sup> injected for one month with PBS (n=8) or osteocalcin (3ng/ml) (n=4). (C-D) Testes cross-sections of WT and *Lhb*<sup>-/-</sup> injected for one month with PBS, osteocalcin (3ng/g/day) or hCG (Human Chorionic Gonadotrophin) (5UI twice a week). (C) Histological analysis of the interstitial tissue hypoplasia (2 first rows) and of the absence of spermatogenesis (2 last rows) observed in *Lhb*<sup>-/-</sup>. While injections of hCG rescue the phenotype, PBS or osteocalcin

injections do not. The black line delimits the frame zoom shows in the second row. The head arrows point the interstitial tissue containing the Leydig cells. RSP (Round Spermatids); ESP (elongated spermatids). (D) Immunofluorescence, using anti-Cyp17, anti-3 $\beta$ -HSD or anti-Cyp11a antibodies as markers of mature Leydig cells (F) Testis size and (G) testis weight in *Lhb*<sup>-/-</sup> injected with PBS (n=8), osteocalcin (n=4) or hCG (n=3) compared to WT.

### Figure 3

#### Analysis of the *Osteocalcin*-deficient male mice fertility after hCG injection

(A) Sperm count, (B) testis weight, (C) epididymis weight and (D) seminal vesicle weight, (E) circulating testosterone levels in WT and osteocalcin<sup>-/-</sup> mice at 10-weeks of age, both injected either with PBS (WT n=10; osteocalcin<sup>-/-</sup> n=6) or hCG (WT n=4; osteocalcin<sup>-/-</sup> n=5) (5UI).

**Figure 4****The osteocalcin reproductive function is hampered in absence of proper bone resorption**

(A) Schematic representation of the strategy used to generate *Ctsk-Cre;DTA<sup>fl/+</sup>* male mice. (B-D) Histological and histomorphometric analyses of vertebrae in control (n=8) and *Ctsk-Cre;DTA<sup>fl/+</sup>* (n=9) male mice 4 months after transplantation. (B) Von Kossa/Van giesen staining. Bone volume over trabecular volume (BV/TV%) is indicated below the pictures. (C) TRAP staining to reveal osteoclasts. Osteoclasts surface per bone surface (Oc.S/BS (%)) and number of osteoclasts per bone trabecular surface (N. Oc/Bpm (1mm)) are indicated below the pictures. (D) Toluidine blue staining showing an important presence of cartilage remnants (indicating by the star \*) in *Ctsk-Cre;DTA<sup>fl/+</sup>* male mice versus WT. (E) Measurement of uncarboxylated (GLU-OCN), carboxylated (GLA13-OCN), total (Total-OCN) and undercarboxylated (GLU13-OCN) forms of osteocalcin in serum of 10 week-old in *Ctsk-Cre;DTA<sup>fl/+</sup>* versus WT male mice. (F) Sperm counts and (G) circulating testosterone levels in *Ctsk-Cre;DTA<sup>fl/+</sup>* (n=12) versus

WT (n=11) male mice. **(H)** qPCR analysis of the expression of steroidogenic acute regulatory protein (*Star*), Cholesterol side-chain cleavage enzyme (*Cyp11a*), cytochrome P-450 17  $\alpha$  (*Cyp17*), 3- $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase (*3 $\beta$ -HSD*), aromatase enzyme (*Cyp19*), and 17-  $\beta$ - hydroxysteroid dehydrogenase (*HSD-17*) in *Ctsk-Cre;DTA<sup>fl/+</sup>* (n=12) compared to WT (n=11) male mice.

## Figure 5

### **An increase in osteoclast number favors both osteocalcin activity and male fertility**

**(A)** Measurement of uncarboxylated (GLU-OCN), carboxylated (GLA13-OCN), total (Total-OCN) and undercarboxylated (GLU13-OCN) forms of osteocalcin in serum, **(B)** sperm count, **(C)** testis weight, **(D)** epididymis weight and **(E)** seminal vesicle weight, **(F)** circulating testosterone levels in WT (n=12) and *Opg*<sup>-/-</sup> (n=12) mice at 12-weeks of age.

**Figure 6****Insulin signaling in osteoblasts favors testosterone production.**

(A) Testis size, (B) sperm count, (C) testis weight, (D) epididymis weight, (E) seminal vesicle weight, (F) circulating testosterone levels and (G) circulating LH levels in *InsR<sub>osb</sub><sup>-/-</sup>* versus WT male mice. (H) qPCR analysis of the expression of qPCR analysis of *StAR*, *Cyp11a*, *Cyp17*, *3 $\beta$ -HSD*, *Cyp19*, and *HSD-17* gene expression in testes of *InsR<sub>osb</sub><sup>-/-</sup>* (n=10) and WT (n=12) mice.

**Figure 7****Insulin signaling in osteoblasts promotes male fertility in an osteocalcin-dependent manner**

(A) Sperm counts, (B) testis weight, (C) epididymis weight, (D) seminal vesicle weight, (E) circulating testosterone levels and (F) circulating LH levels in *InsR<sub>osb</sub><sup>+/-</sup>* (n=5), *InsR<sub>osb</sub><sup>+/-</sup>; Osteocalcin<sup>+/-</sup>* (n=6) and *InsR<sub>osb</sub><sup>+/-</sup>; Gprc6a<sup>+/-</sup>* (n=5), versus control (n>8)

male mice. **(G)** Schematic representation of the pancreas-bone-testis axis regulating testosterone production in male mice.

### **Table 1**

#### **Hormonal and metabolic profiles of the patient presenting an F464Y amino acid substitution of *GPRC6A***

Table containing the values of the bone profile (Calcium serum content (mmol/L), parathyroid hormone (PTH) (pg/ml), osteocalcin (ng/ml)), metabolic profile (HbA1C (%), Glycemia (mmol/L), insulin (mUI/L), C-peptide (nmol/L)), sexual hormone profile (serum free testosterone (nmol/L), plasmatic testosterone (nmol/L), Follicle-stimulating hormone (FSH) (UI/L), Luteinizing hormone (LH) (UI/L)), body densitometry (body mass index (BMI), Total mineral mass (%), Body fat mass (%), Lean body mass (%)) of the patient presenting an F464Y amino acid substitution of *GPRC6A*.

**Table 2****Oral glucose tolerance test performed in the patient presenting an F464Y amino acid substitution of *GPRC6A***

Glycemia (mmol/L), Insulin (mUI/L) and C-Peptide (nmol/L) were measured in serum of the patient harboring the F464Y substitution of *GPRC6A* by comparison to a control. The blood samples were collected after 12 hours fasting (T0) prior to the test and 2 hours after oral administration of 75 mg of glucose solution to drink. The 2 hour oral GTT glucose level should be below 7.8 mmol/L. Levels between this and 11.1 mmol/l indicate impaired glucose tolerance. Glucose levels above 11.1 mmol/l at 2 hours confirms a diagnosis of diabetes.

## Supplemental Figures

### Figure S1

(A) Schematic representation of *GPRC6A* locus (6 exons in red). (B) Schematic representation of the amino acid sequence containing the substitution. This region is highly conserved in several species and the amino acid mutated in the patients is highlighted in red.

### Figure S2

(A) Western blot analysis of MYC in HEK293 cells transfected with *GPRC6A*-pcDNA3 or *GPRC6A* mutant-pcDNA3. Beta-tubulin has been used for the loading control.

### Figure S3

(A) Analysis of 2 week-old *Lhb*<sup>-/-</sup> male mice injected for one month with PBS (n=5), osteocalcin (3ng/g/day) (n=5) or hCG (Human Chorionic Gonadotrophin) (5UI twice a week) (n=5). Immunofluorescence, using anti-Cyp17, anti-3 $\beta$ -HSD or anti-Cyp11a antibodies as markers of mature Leydig cells. (B) cAMP production upon osteocalcin

stimulation (1H with increasing dose of osteocalcin) is increased in TM3 Leydig cells.

HCG stimulation was used as a positive control.

#### **Figure S4**

(A) *Ctsk-Cre;DTA<sup>fl/+</sup>* mice developed a classical osteopetrosis phenotype characterized by very dense bone on X-ray and an absence of incisors eruption because of a severe impairment in bone resorption.

#### **Figure S5**

(A) Testis weight, (B) epididymis weight and (C) seminal vesicle weight in *Ctsk-Cre;DTA<sup>fl/+</sup>* (n=12) versus WT (n=11) male mice at 3 months of age.

## References

1. Lee NK, Sowa H, Hinoi E, Ferron M, Ahn JD, *et al.* (2007) Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton. *Cell* 130, 456-469.
2. Oury F, Sumara G, Sumara O, Ferron M, Chang H, *et al.* (2011) Endocrine regulation of male fertility by the skeleton. *Cell* 144, 796-809.
3. Pi, M., Wu, Y., and Quarles, L.D. (2011) GPRC6A mediates responses to osteocalcin in beta-cells in vitro and pancreas in vivo. *J Bone Miner Res* 26, 1680-1683.
4. Fernandez-Real JM, Izquierdo M, Ortega F, Gorostiaga E, Gomez-Ambrosi J, *et al.* (2009) The relationship of serum osteocalcin concentration to insulin secretion, sensitivity, and disposal with hypocaloric diet and resistance training. *J Clin Endocrinol Metab* 94, 237-245.
5. Im JA, Yu BP, Jeon JY, & Kim SH (2008) Relationship between osteocalcin and glucose metabolism in postmenopausal women. *Clin Chim Acta* 396, 66-69.
6. Saleem U, Mosley TH, Jr., & Kullo IJ (2010) Serum osteocalcin is associated with measures of insulin resistance, adipokine levels, and the presence of metabolic syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 30, 1474-1478.
7. Kirmani, S., Atkinson, E.J., Melton, L.J., 3rd, Riggs, B.L., Amin, S., and Khosla, S. (2011). Relationship of testosterone and osteocalcin levels during growth. *J Bone Miner Res* 26, 2212-2216.
8. Ma X, Dong Y, Matzuk MM, & Kumar TR (2004) Targeted disruption of luteinizing hormone beta-subunit leads to hypogonadism, defects in gonadal steroidogenesis, and infertility. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 17294-17299.
9. Kumar TR (2007) Functional analysis of LHbeta knockout mice. *Mol Cell Endocrinol* 269, 81-84.
10. Themmen APN & Huhtaniemi IT (2000) Mutations of gonadotropins and gonadotropin receptors: elucidating the physiology and pathophysiology of pituitary-gonadal function. *Endocr Rev* 21, 551-583.
11. Pi M, Chen L, Huang MZ, Zhu W, Ringhofer B, *et al.* (2008) GPRC6A null mice exhibit osteopenia, feminization and metabolic syndrome. *PLoS One* 3, e3858.
12. Boisen KA, Main KM, Rajpert-De Meyts E, & Skakkebaek NE (2001) Are male reproductive disorders a common entity? The testicular dysgenesis syndrome. *Ann NY Acad Sci* 948, 90-99.
13. Paduch DA (2006) Testicular cancer and male infertility. *Curr Opin Urol* 16, 419-427.
14. Sharpe RM & Skakkebaek NE (2008) Testicular dysgenesis syndrome: mechanistic insights and potential new downstream effects. *Fertil Steril* 89, e33-38.
15. Bousfield GR & Ward DN (1994) Evidence for two folding domains in glycoprotein hormone alpha-subunits. *Endocrinology* 135, 624-635.
16. Pierce JG & Parsons TF (1981) Glycoprotein hormones: structure and function. *Annu Rev Biochem* 50, 465-495.
17. Ferron M 2008

18. Ferron M, Wei J, Yoshizawa T, Del Fattore A, DePinho RA, *et al.*, (2010) Insulin signaling in osteoblasts integrates bone remodeling and energy metabolism. *Cell* 142, 296-308.
19. Nakamura T, Imai Y, Matsumoto T, Sato S, Takeuchi K, *et al.* (2007) Estrogen prevents bone loss via estrogen receptor alpha and induction of Fas ligand in osteoclasts *Cell* 130, 811-823.
20. Yoshikawa Y, Kode A, Xu L, Mosialou I, Silva BC, *et al.*, (2011) Genetic evidence points to an osteocalcin-independent influence of osteoblasts on energy metabolism. *J Bone Miner Res* 26, 2012-2025.
21. Yun TJ *et al.*, "Osteoprotegerin, a crucial regulator of bone metabolism, also regulates B cell development and function." *J Immunol* 2001 Feb 1;166(3):1482-91.
22. Burns KH & Matzuk MM (2002) Minireview: genetic models for the study of gonadotropin actions. *Endocrinology* 143, 2823-2835.
23. Haffner SM (2000) Sex hormones, obesity, fat distribution, type 2 diabetes and insulin resistance: epidemiological and clinical correlation. *Int J Obes Relat Metab Disord* 24 Suppl 2, S56-58.
24. Mah PM & Wittert GA (2010) Obesity and testicular function. *Mol Cell Endocrinol* 316, 180-186.
25. Pasquali R, Casimirri F, Cantobelli S, Melchionda N, Morselli Labate AM, *et al.*, (1991) Effect of obesity and body fat distribution on sex hormones and insulin in men. *Metabolism* 40, 101-104.
26. Pitteloud N, Hardin M, Dwyer AA, Valassi E, Yialamas M, *et al.*, (2005) Increasing insulin resistance is associated with a decrease in Leydig cell testosterone secretion in men. *J Clin Endocrinol Metab* 90, 2636-2641.
27. Pitteloud N, Mootha VK, Dwyer AA, Hardin M, Lee H, *et al.* (2005) Relationship between testosterone levels, insulin sensitivity, and mitochondrial function in men. *Diabetes Care* 28, 1636-1642.
28. Hinoi E, Gao N, Jung DY, Yadav V, Yoshizawa T, *et al.*, (2008) The sympathetic tone mediates leptin's inhibition of insulin secretion by modulating osteocalcin bioactivity. *J Cell Biol* 183, 1235-1242.
29. Eleftheriou F, Ahn JD, Takeda S, Starbuck M, Yang X, *et al.* (2005) Leptin regulation of bone resorption by the sympathetic nervous system and CART. *Nature* 434, 514-520.
30. Ducy P, Desbois C, Boyce B, Pinero G, Story B, *et al.* (1996) Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice. *Nature* 382, 448-452.
31. Dakhova O, O'Day D, Kinet N, Yucer N, Wiese M, *et al.*, (2009) Dickkopf-like1 regulates postpubertal spermatocyte apoptosis and testosterone production. *Endocrinology* 150, 404-412.
32. Kuang D, Yao Y, Lam J, Tsushima RG, & Hampson DR (2005) Cloning and characterization of a family C orphan G-protein coupled receptor. *J Neurochem* 93, 383-391.

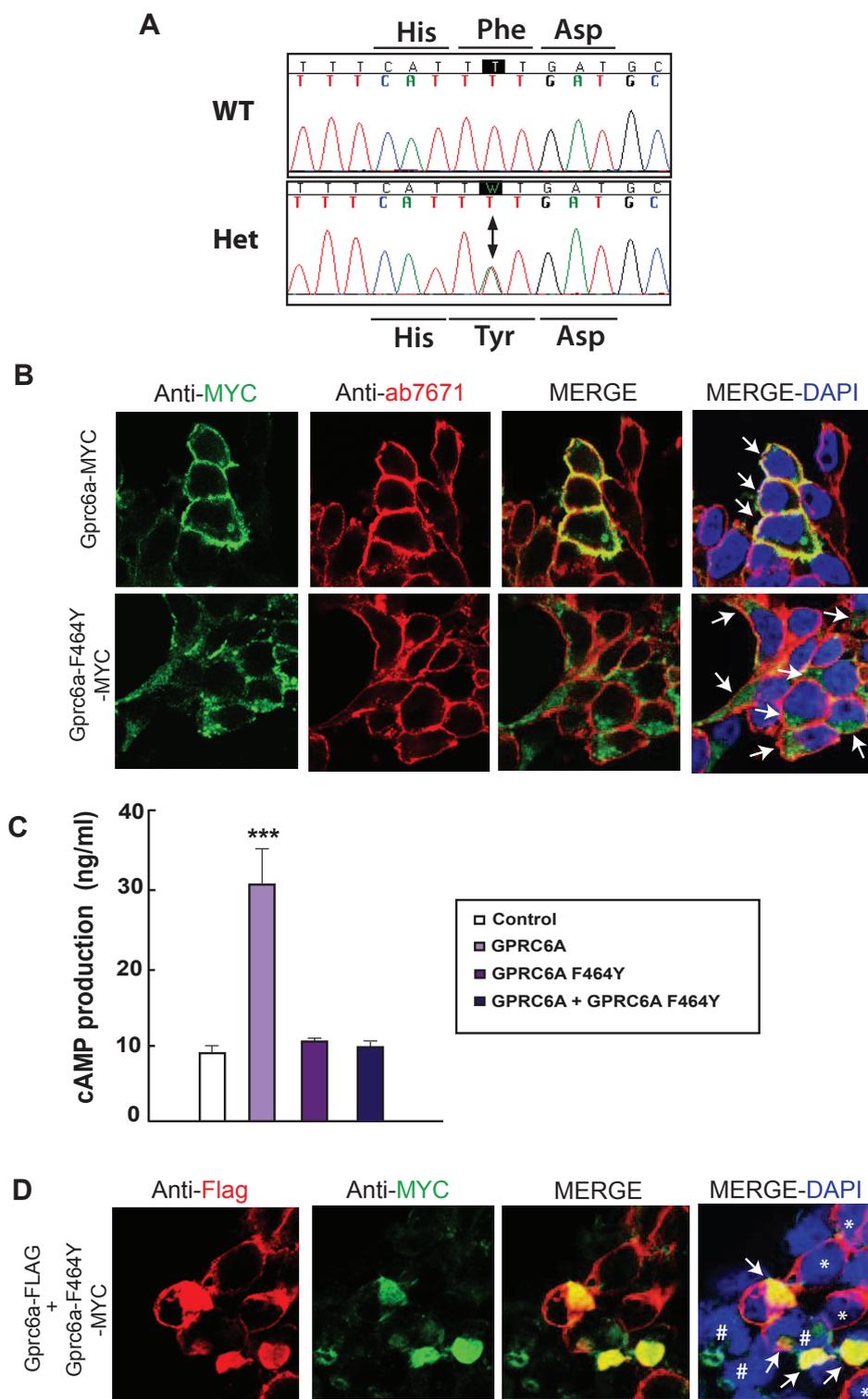


Figure 1

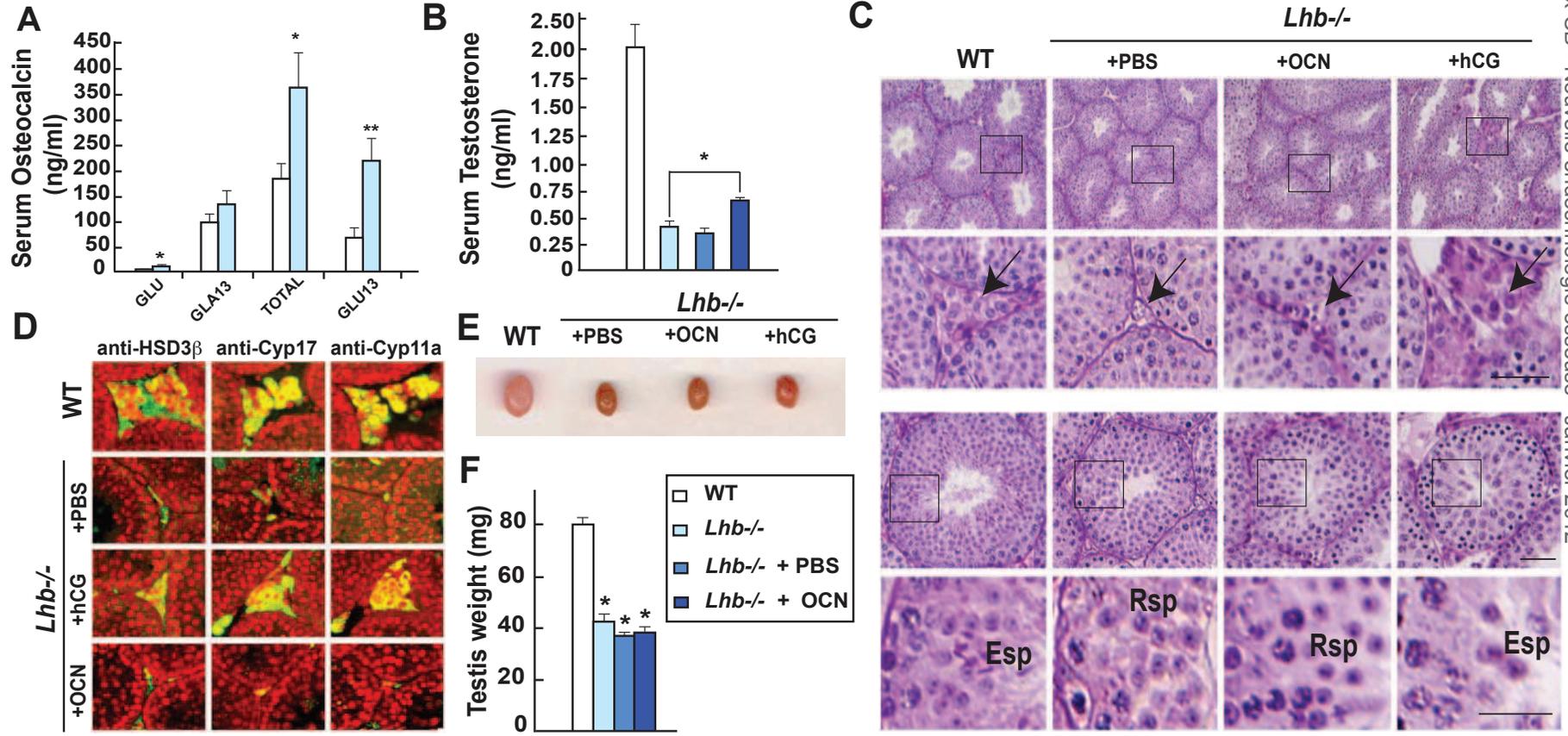


Figure 2

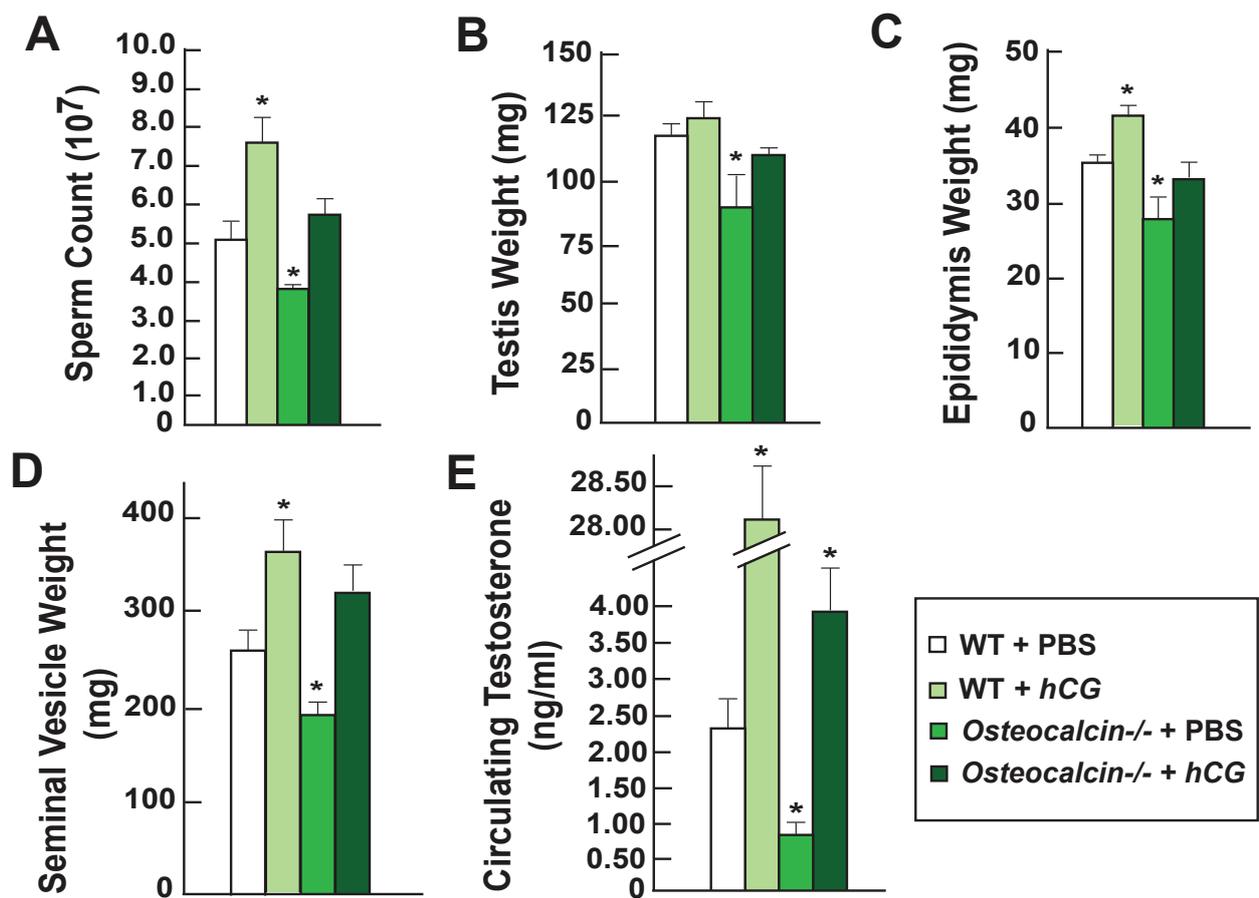


Figure 3

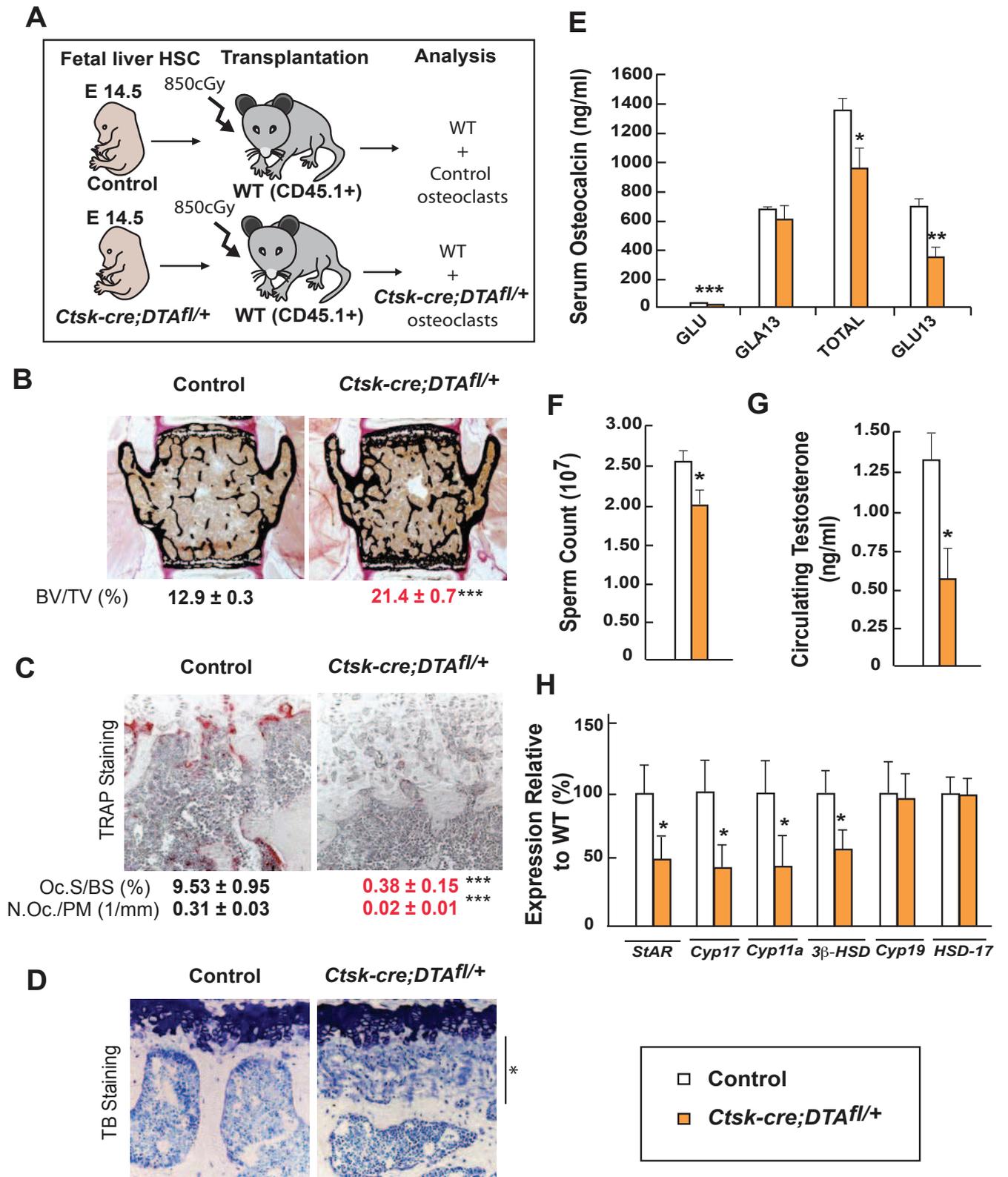


Figure 4

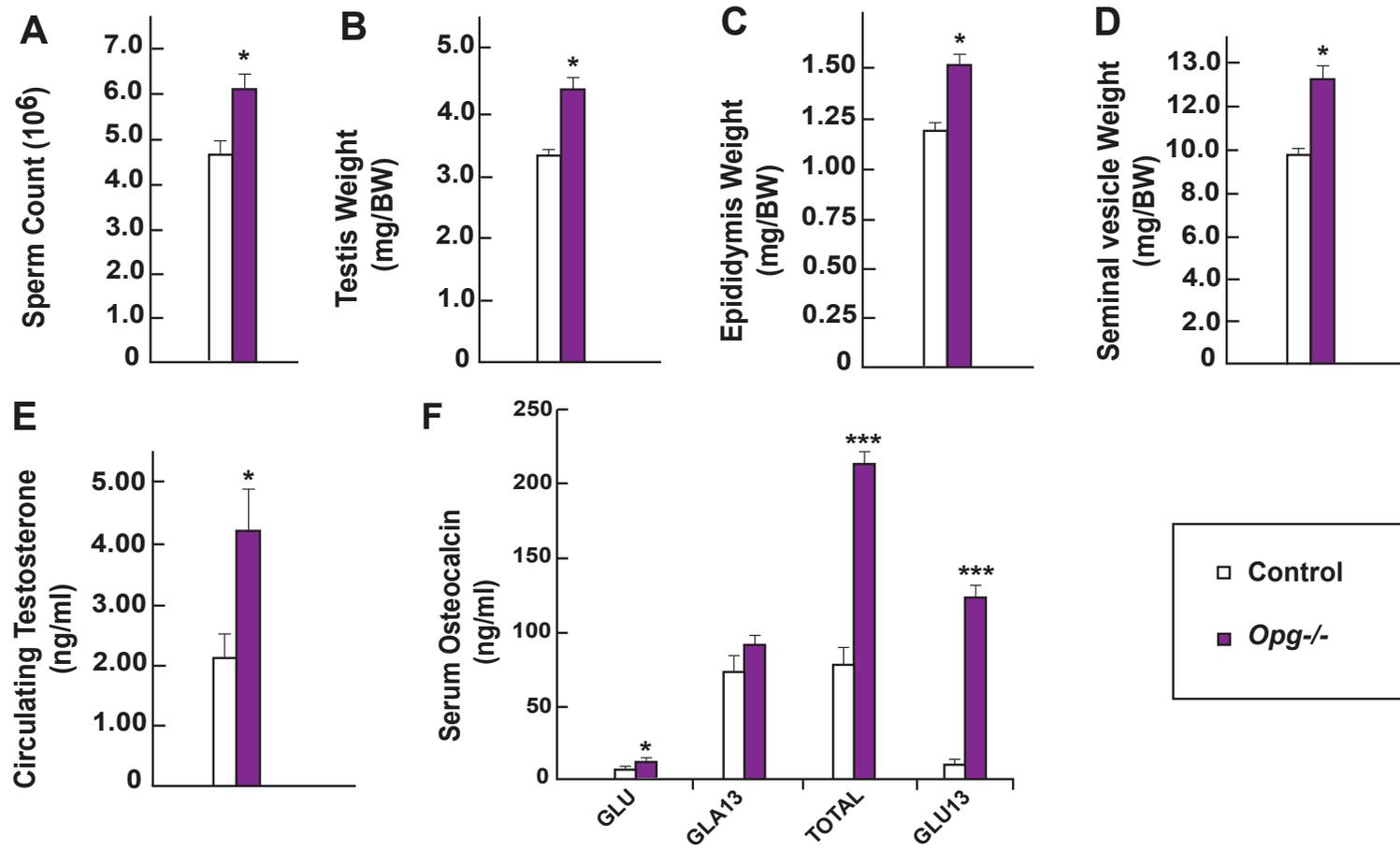


Figure 5

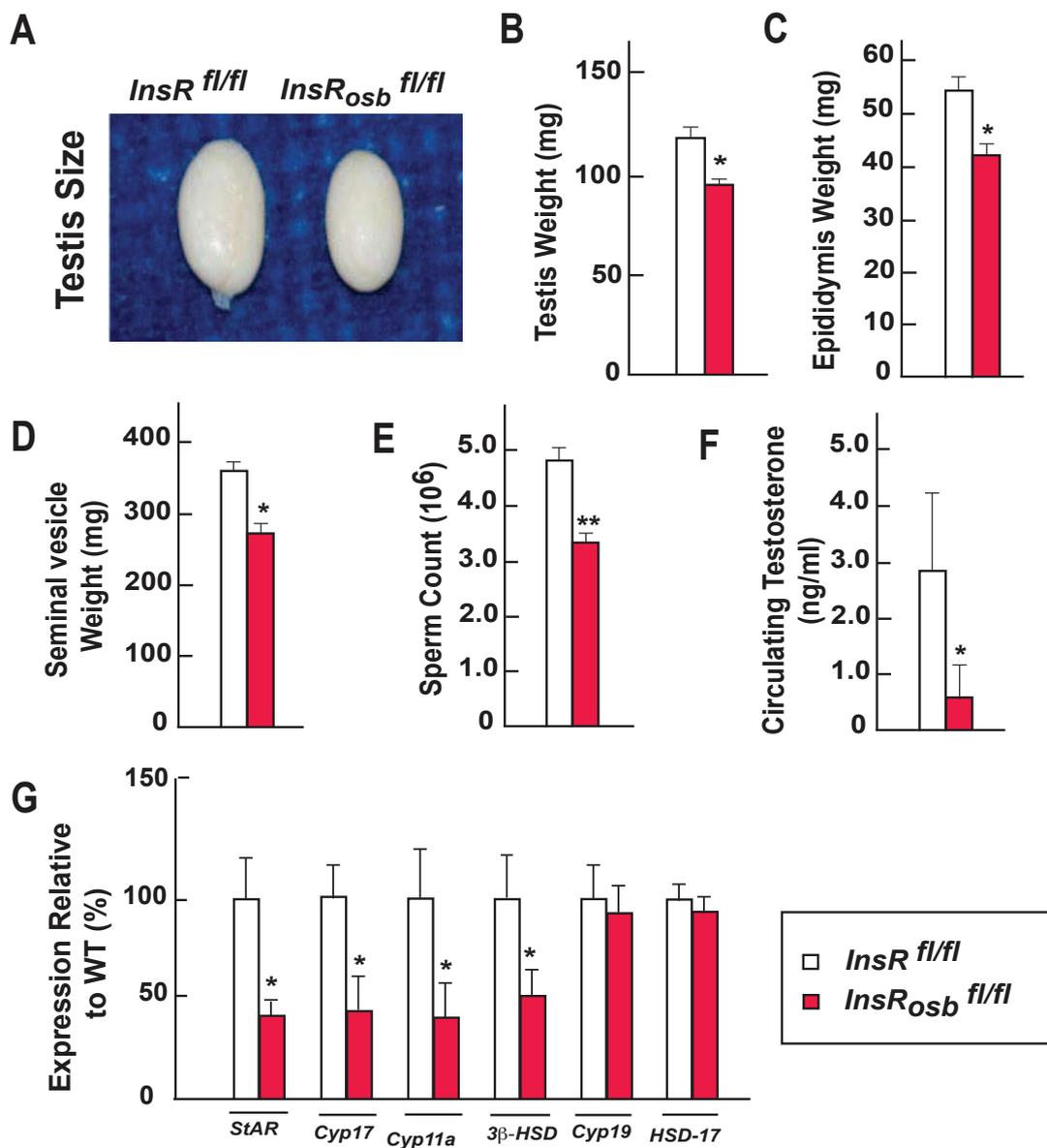


Figure 5

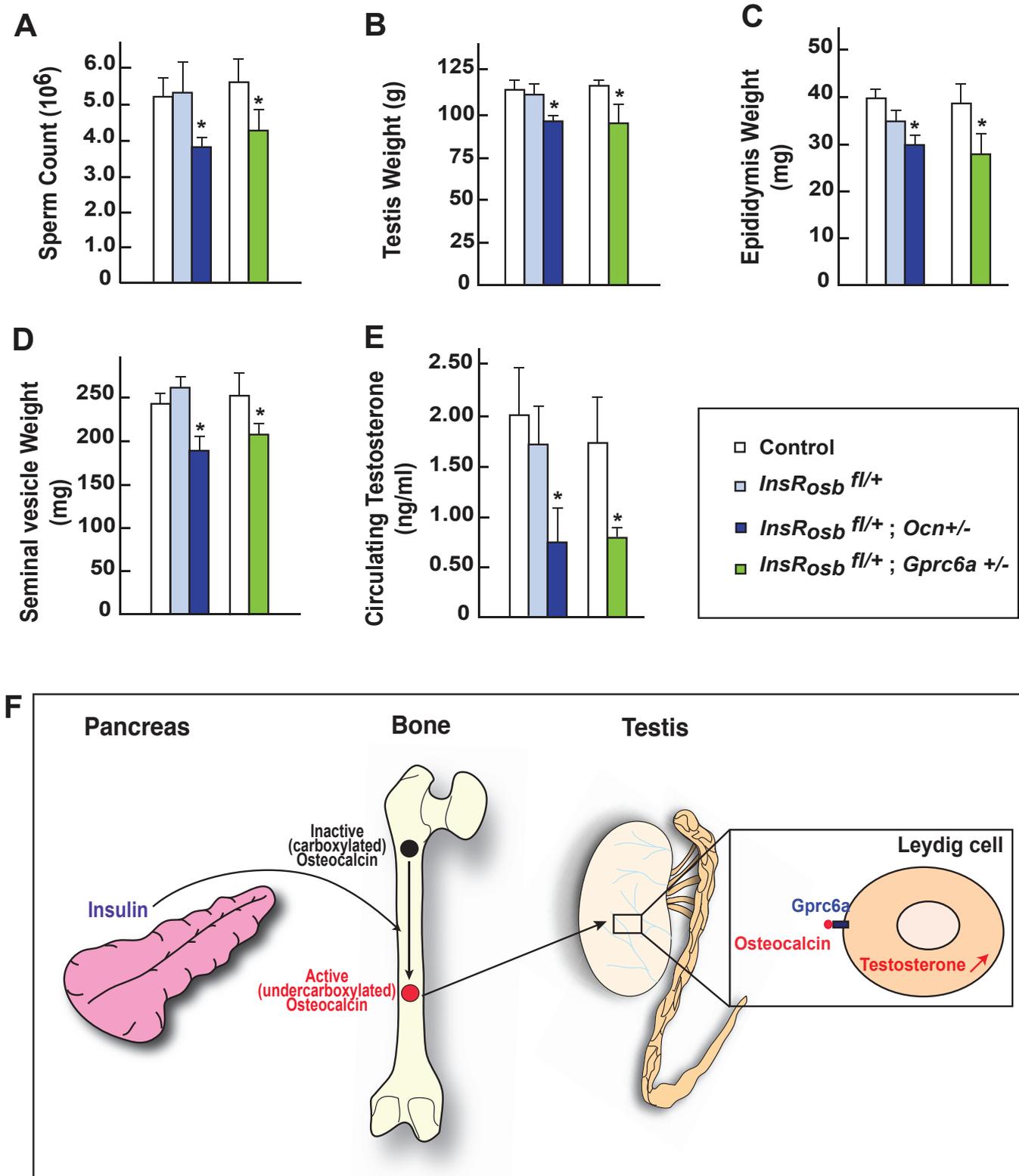
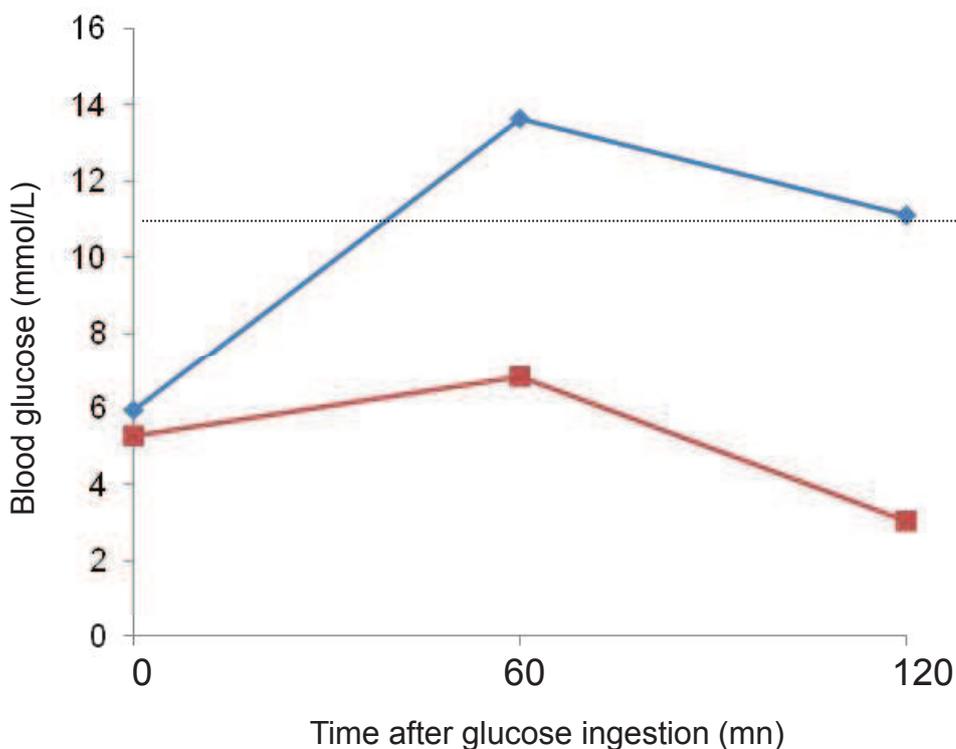


Figure 7

**Figure 8 : Comparative results of the Oral Glucose Tolerance Test (OGTT) performed in the mutated *GPRC6A* patient (blue line) versus a healthy control (red line). Test was performed with 75g of pure glucose absorbed in 3 mn. A blood glucose over 11.1 mmol/L asserts diabetes. The homeostatic model assessment was used to quantify insulin resistance (HOMA -R= blood glucose (mmol/L) x insuline (mUI/L) / 22,5). Healthy volunteer was 33 years old with no medical record, a normal vitamin D level, a normal BMI of 23 kg/m<sup>2</sup> and a normal glycohemoglobine A1c of 5.2%.**



	T0	T1	T2
Blood glucose (mmol/L)	5,96	13,64	11,12
Insuline (mUI/L)	38,8	238,6	739,5
Peptide C (nmol/L)	2,12	5,88	10,55
HOMA-R	10,28	144,64	365,48

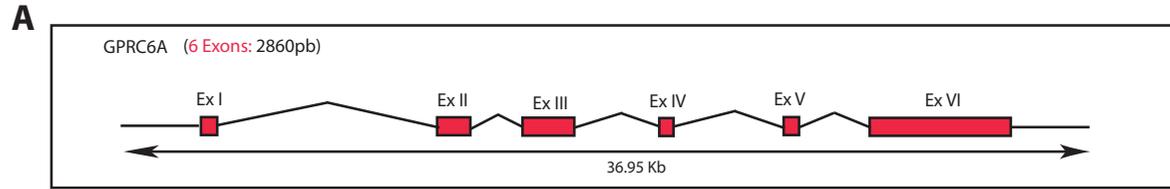
	T0	T1	T2
Blood glucose (mmol/L)	5,27	6,83	3,05
Insuline (mUI/L)	10,3	82,8	12,4
Peptide C (nmol/L)	0,73	3,3	1,89
HOMA-R	2,41	25,13	1,68

— Mutated patient for *GPRC6A*

— Healthy volunteer

		Patient	Normal range
Bone profile	Calcium mmol/L	2.3	2.12 - 2.52
	PTH pg/ml	35	15.0 - 65.0
	Osteocalcin ng/ml	14	14.0 - 42.0
Metabolic profile	HbA1C %	6.50	4.0 - 6.0
	Glycemia mmol/L	5.80	4.1 - 5.8
	Insulin mUI/L	35.70	2.0 - 25.0
	C-Peptide nmol/L	2.19	0.22 - 0.83
Sexual hormone profile	Free Testosterone nmol/L	1.42	2.25 - 10.7
	Plasma Testosterone nmol/L	9.25	10.4 - 26.0
	LH UI/L	13.10	0.5 - 10.0
	FSH UI/L	32.60	1.3 - 11.5
Body densitometry	BMI	31.60	<25
	Total mineral mass (BMC)%	3.06	
	Body fat mass %	28.07	15 - 20
	Lean body mass %	68.92	

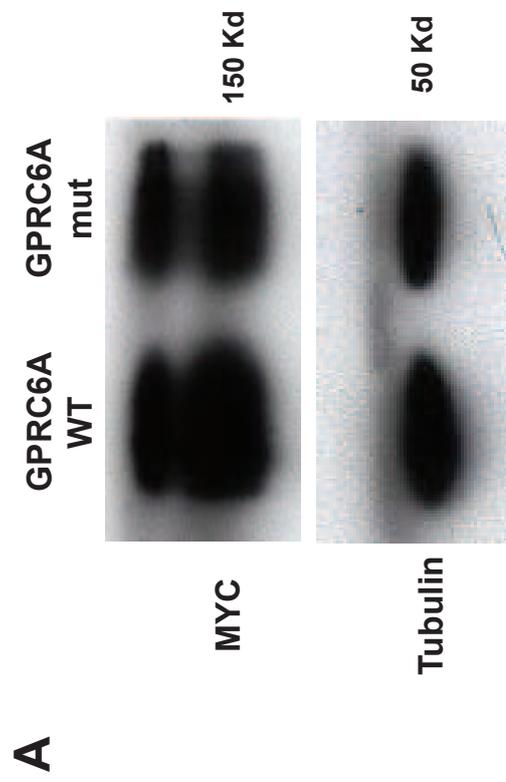
**Table 1**



**B**

			<b>464</b>			
Homo sapiens	<a href="#">NP 683766.2</a>	444	WELLGVLKNTFTDGNFSFH	F	DAHGDLNTGYDVVLWK-EINGHMT	487
Pan troglodytes	<a href="#">XP 527484.2</a>	444	WELLCVLKNTFTDCWNSFH	F	DAHCDLNTGYDVVLWK-EINGHMT	487
Canis lupus familiaris	<a href="#">XP 541212.1</a>	444	WELLDVLKNTFTDECNSFH	F	DAHCDMNTGYDVVLWK-EICGHMT	487
Mus musculus	<a href="#">NP 694711.1</a>	444	WELLAVLKNTFTDCRNSFH	F	DAHCDLNTGYDVVLWK-ETNCLMT	487
Rattus norvegicus	<a href="#">XP 228164.3</a>	444	WELLAVLKNTFTDGKNSFH	F	DAHGDLNTGYEVVLWK-ETNGLMT	487
Danio rerio	<a href="#">XP 426177.2</a>	441	WELLEELKKVTIIDDDKEIH	F	DSKGDLSG YDVVLWK-EVDGRME	484

**Figure S1**



**Figure S2**

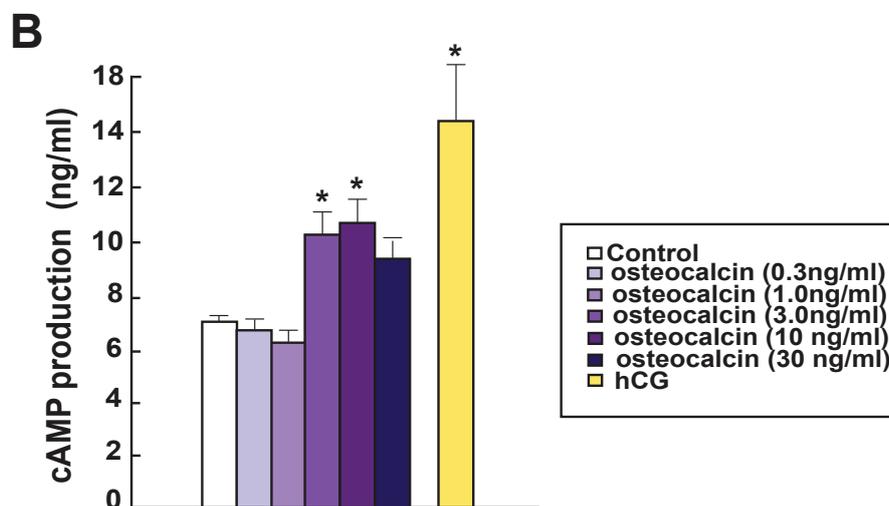
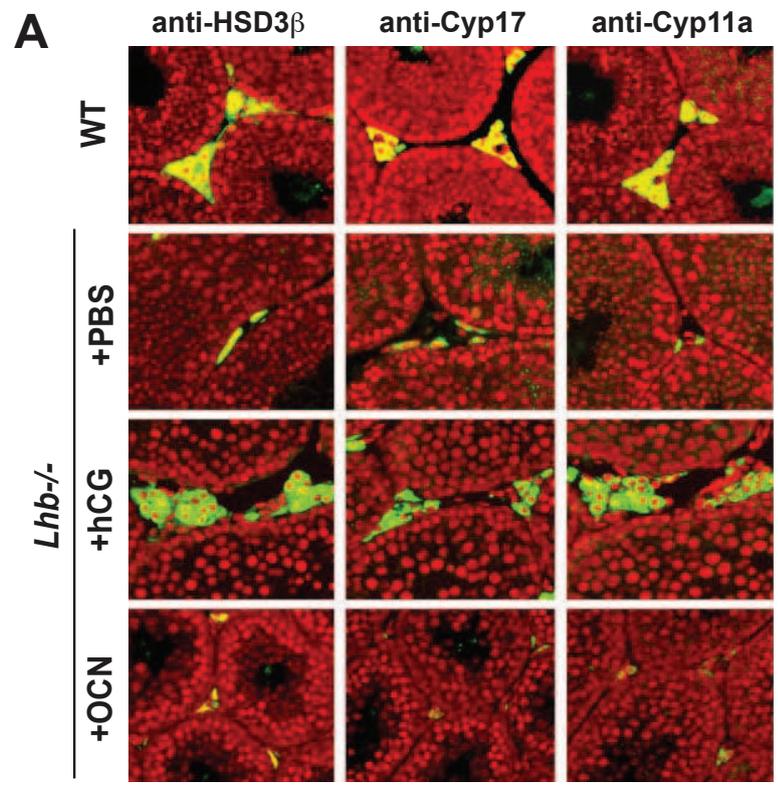
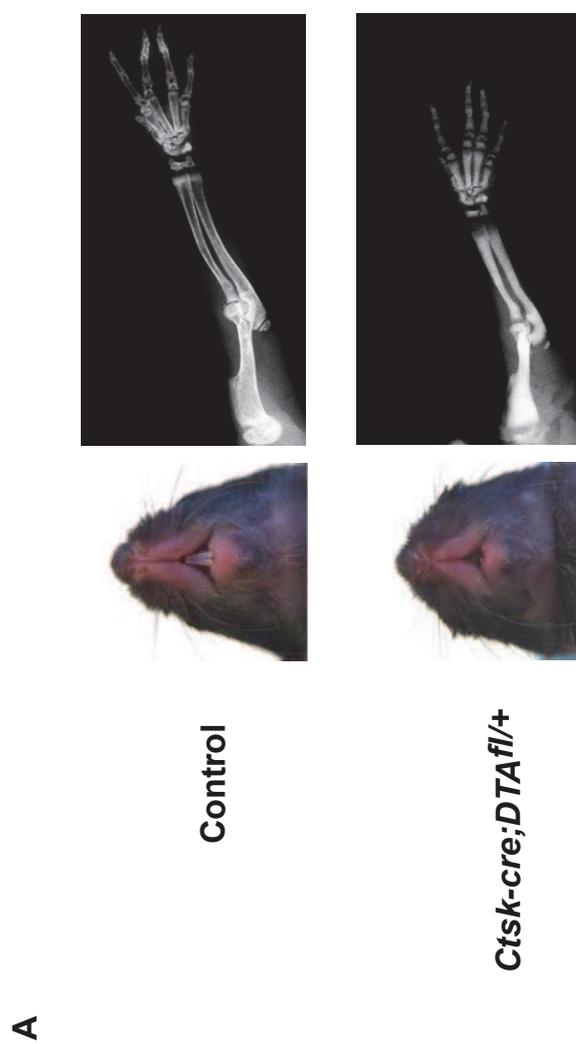


Figure S3



**Figure S4**

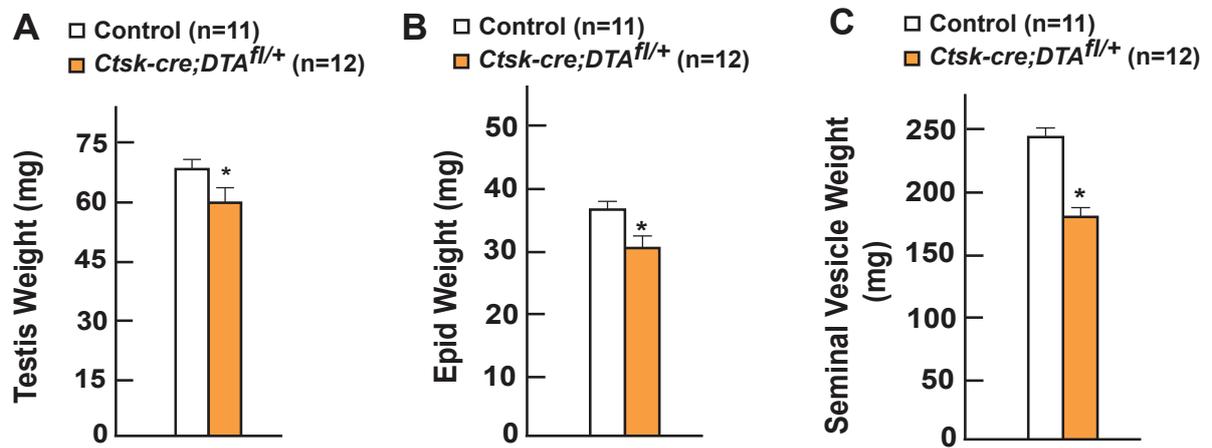


Figure S5

## V- Perspectives

### 1) Screening génétique des patients et limitation

Dans notre étude, parmi les 52 patients identifiés comme ayant une insuffisance gonadotrope périphérique inexplicée, seul un patient présentait une mutation du gène de l'ostéocalcine ou de son récepteur. Le séquençage génétique réalisé n'a porté que sur les exons. Il est possible que d'autres mutations, soit dans les introns soit dans le promoteur, puissent influencer l'ostéocalcine ou son récepteur.

Notre travail a permis l'identification de la première mutation chez l'homme du récepteur de l'ostéocalcine. De façon intéressante, le patient décrit ici présentait l'ensemble du phénotype des souris déficientes en *ostéocalcine* à savoir hypofertilité et syndrome métabolique. Il s'agit d'une étape essentielle du transfert des données entre l'animal et l'homme. Ce travail appelle la réalisation d'études de cohorte de grande envergure à la recherche d'autres patients porteurs de la mutation F464Y, et également l'identification de polymorphismes de *GPRC6A* modifiant le phénotype voire de nouvelles mutations dans les introns ou le promoteur affectant la voie de signalisation de l'ostéocalcine et de son récepteur GPRC6A.

### 2) Ostéocalcine et testostérone chez l'homme dans les études épidémiologiques

Une première étude épidémiologique vient d'être publiée à la suite de l'article princeps montrant le lien entre la testostérone et ostéocalcine. Dans cette étude, de la Mayo Clinic, Kirmani *et al.*<sup>284</sup> ont mesuré la testostérone sérique, l'ostéocalcine totale et non carboxylée ainsi que la circonférence du radius chez 56 garçons en bonne santé âgés de 4 à 20 ans. La mesure de la circonférence du radius a été réalisée par HRpQCT (Scanco®). La mesure de la testostérone a été obtenue par spectrométrie de masse. La limite de détection du dosage était de 1ng/dL et le coefficient de variation de 6 %. L'ostéocalcine sérique a été mesurée par dosage Elisa (Quidel, San Diego-CA, USA®) et l'ostéocalcine non carboxylée par dosage Elisa (kit Takara, Shiga, Japan®). Les coefficients de variation des dosages de l'ostéocalcine étaient <10 %. Après ajustement, l'ostéocalcine était le seul marqueur osseux significativement associé avec la testostérone ( $r=0.30$ ;  $p=0.024$ ), l'ostéocalcine non carboxylée allant dans le même sens. De façon intéressante, le dosage de testostérone augmente à partir de l'âge osseux de 11 ans. De même l'ostéocalcine augmente précocement à la puberté et atteint son maximum pour un âge osseux de 14 ans. Les auteurs ont donc divisé leur population en trois groupes : phase prépubertaire (de 4 à 14 ans), phase précoce de la puberté (de 11 à 14 ans) et phase tardive de la puberté (de 15 à 20 ans).

Au moment de la croissance rapide (groupe de 11 à 14 ans), l'ostéocalcine était significativement associée avec la testostérone alors qu'il n'y avait pas d'association significative avec le P1NP. De même la testostérone était corrélée avec la circonférence périostée dans ce groupe. Dans le groupe 11-14 ans, l'ostéocalcine était corrélée avec la circonférence périostée.

Dans cette étude, les auteurs n'ont pas mesuré LH. Les résultats sont globalement plus robustes avec le dosage d'ostéocalcine totale. Dans notre expérience ceci est

bien concordant avec les résultats personnels que nous avons pu obtenir auparavant avec le kit Takara®.

Cette étude est concordante avec les résultats observés chez la souris par Oury *et al.* dans l'étude princeps. Toutefois il s'agit d'une étude transversale qui ne peut établir de lien de causalité. Cette étude fut la première à montrer des résultats chez l'homme entre ostéocalcine et fertilité. À notre connaissance, il n'y a pour l'instant pas d'autre étude publiée chez l'homme.

### **3) Résorption osseuse et fertilité**

Notre étude met clairement en évidence un lien entre résorption et fertilité. L'axe pancréas-os-testicule qui est décrit ici est indépendant et synergique de l'axe hypophysaire (LH) classique. Il fait intervenir l'ostéoprotégérine comme facteur clé modulant la résorption osseuse. Cette observation suggère logiquement que les autres facteurs impliqués dans le contrôle de la résorption osseuse comme la parathormone et le système nerveux sympathique pourraient avoir un effet sur le métabolisme énergétique et la régulation de la fertilité <sup>27, 71</sup>. De même, les thérapeutiques antirésorptives actuelles agissant sur le ratio ostéoprotégérine/RANKL pourraient agir sur la fertilité et le métabolisme énergétique. De plus amples études semblent nécessaires pour préciser ce point.

## Synthèse du modèle et perspectives

Par delà mon propre travail, j'ai rassemblé dans cette thèse l'ensemble des éléments du modèle actuel de physiologie intégrative entre l'os et le métabolisme énergétique. Figure 41. Comme nous l'avons vu, sous l'effet de la leptine sécrétée par le tissu adipeux, le métabolisme énergétique exerce une action indirecte négative sur la masse osseuse et l'ostéoblaste en passant par une intégration neurologique centrale au niveau du tronc cérébral et de l'hypothalamus via la sérotonine cérébrale et le système nerveux sympathique.

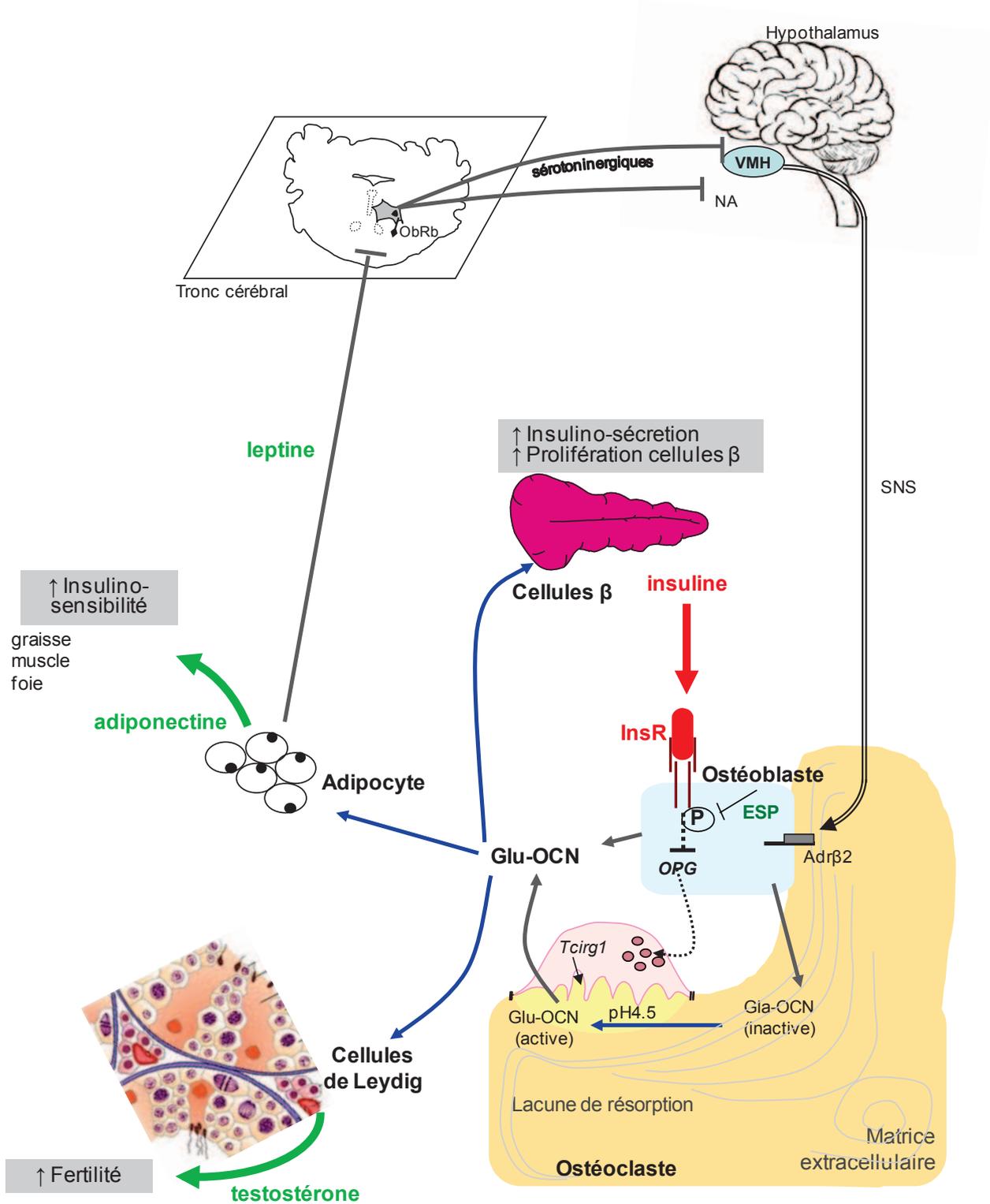
En retour, l'os régule le métabolisme énergétique en produisant de l'ostéocalcine non carboxylée par sécrétion directe des ostéoblastes. L'ostéocalcine non carboxylée est active et agit sur les cellules du pancréas en stimulant la prolifération des cellules  $\beta$  pancréatiques et en augmentant leur sécrétion d'insuline. L'ostéocalcine réduit aussi l'insulinorésistance périphérique en stimulant la production d'adiponectine par les adipocytes. Il se surajoute une boucle d'amplification directement du pancréas sur l'ostéoblaste par l'insuline. Dans l'ostéoblaste, la voie de signalisation de l'insuline, régulée par OST-PTP (produit du gène *Esp*), vient freiner la production d'ostéoprotégérine ce qui augmente le ratio RANKL/OPG et donc la résorption osseuse libérant de l'ostéocalcine non carboxylée active.

Par ailleurs, l'ostéocalcine non carboxylée, qu'elle soit sécrétée par l'ostéoblaste ou issue de la résorption osseuse, possède, en plus de son action sur le pancréas et les adipocytes, une action sur les cellules de Leydig. Ainsi l'ostéocalcine stimule-t-elle la production de testostérone et donc la fertilité directement au niveau des testicules. L'axe « pancréas (insuline) -os (ostéocalcine) -testicules (testostérone) » est donc un axe nouveau, à considérer comme complémentaire et indépendant de l'axe classique hypothalamo-hypophysaire médié par GnRH et LH.

Dans une perspective d'évolution et de pression de sélection effectuée au fil du temps sur l'espèce, une analyse finaliste pourrait suggérer que ce modèle d'ostéocalcine se surajoute au modèle déjà existant de l'insuline et du glucagon et constitue une sorte de « thermostat énergétique » du corps. En cas de « bonne santé » et d'apports énergétiques suffisants, l'ostéocalcine non carboxylée est élevée délivrant un feu vert sur la fertilité par son action sur la testostérone. En effet, l'ostéocalcine agit directement sur la phase terminale de la différenciation des spermatozoïdes (spermiogenèse) et permet la transmission de la vie. Dans le cas contraire, la fertilité est diminuée.

Il existe encore un certain nombre d'éléments manquants à ce modèle. Par exemple, l'intégration de la dépense énergétique n'a jamais été démontrée de façon directe chez l'animal. Des travaux suggèrent cependant que l'activité physique et la dépense énergétique pourraient moduler l'ostéocalcine. Cela a été rapporté dans l'étude Australienne de Levinger *et al.*<sup>285</sup> chez des sujets obèses d'âge moyen

Figure 41 : synthèse du modèle



soumis soit à 45 minutes d'aérobic soit à des exercices de renforcement musculaire. Les dosages ont été réalisés avant l'exercice et 2h après l'exercice et les auteurs observent après les deux types d'exercices une diminution de la glycémie. En revanche seule l'aérobic augmente significativement l'ostéocalcine totale et non carboxylée ainsi que l'adiponectine. Le travail de force a peu d'effet. Une autre étude publiée par le groupe de Benhamou à Orléans<sup>286</sup> chez des enfants obèses soumis ou non à une activité physique régulière va dans le même sens tout comme celle de Rector<sup>287</sup> et d'Adami<sup>288</sup>. L'étude de Lester, réalisée chez 56 femmes soumises à une activité physique pendant huit semaines, a également montré une augmentation d'ostéocalcine à l'issue du programme<sup>289</sup>. Ce mécanisme d'augmentation ostéocalcine après activité physique régulière semble conservé également chez le sujet âgé même si la différence de réponse entre hommes et femmes reste à vérifier<sup>290</sup>. Au contraire, dans des conditions extrêmes comme celle d'une course de fond de 246 km, l'ostéocalcine a été transitoirement supprimée après la course reflétant sans doute l'aspect inhabituel et excessif d'un tel exercice<sup>291</sup>. Enfin tout récemment une étude de huit semaines réalisée chez 44 femmes ménopausées (17 contrôles et 27 dans un programme d'activité physique à raison de 40 minutes de vélo trois fois par semaine) a montré une baisse d'ostéocalcine qui semble discordante par rapport aux autres études publiées jusque-là<sup>292</sup>. De nouvelles études sont en attente.

Face à l'épidémie mondiale d'obésité et de syndrome métabolique, l'ostéocalcine non carboxylée représente un espoir nouveau et important pour la prise en charge des patients. Les essais de traitement des souris sauvages par de l'ostéocalcine non carboxylée soit par pompe continue soit par voie sous-cutanée intermittente permettent d'entrevoir des retombées médicales importantes. L'identification du récepteur de l'ostéocalcine GPRC6A constitue une étape clé dans l'élaboration d'une thérapeutique future pour l'homme.

Pour l'instant tout l'intérêt s'est focalisé sur l'ostéocalcine produite par l'ostéoblaste. S'agit-il du seul mécanisme emprunté par l'os pour agir sur le métabolisme énergétique ? La publication récente de souris transgéniques exprimant spécifiquement la toxine diphtérique dans les ostéoblastes et générant ainsi une réduction d'au moins 50 % des ostéoblastes a soulevé la question<sup>101</sup>. En effet le traitement de ces souris avec l'ostéocalcine recombinante à eu un effet bénéfique sur l'insulinosécrétion mais partiel sur l'insulinorésistance suggérant qu'il pourrait exister d'autres molécules sécrétées par l'os qui seraient actives sur le métabolisme énergétique.

En quelques années, l'ostéocalcine est passé du statut de marqueur osseux de formation à celui d'hormone impliquée dans la physiologie entre l'os et le métabolisme énergétique. Une évolution similaire est en route avec la SHBG dont le gène est situé sur le chromosome 17p12-p13. Comme nous l'avons vu précédemment, il s'agit d'une glycoprotéine de transport des hormones sexuelles circulant sous forme homodimérique. Elle est produite majoritairement par le foie mais son ARNm est aussi exprimé par la prostate, les testicules, les ovaires, l'endomètre, les seins et l'hypothalamus. Jusqu'à présent, son rôle physiologique, baptisé « free hormone hypothesis », était de réguler la fraction libre et disponible des hormones sexuelles pour les tissus<sup>293</sup>. Ultérieurement, il a été montré que la SHBG exerçait aussi une action directe sur les cellules hormonosensibles en modulant la prolifération cellulaire et le passage intracellulaire des hormones

sexuelles stéroïdes par l'intermédiaire de l'activation d'un récepteur spécifique et de haute affinité présent à la surface cellulaire <sup>294-297</sup>.

Parallèlement, un nombre croissant d'études épidémiologiques transversales et prospectives est publié, montrant une corrélation inverse entre les taux de SHBG et la glycémie, le taux d'hémoglobine glycosylée HbA1c et le risque de survenue de diabète de type II dans la population normale indépendamment des hormones sexuelles <sup>298-304</sup>. Le *et al.* ont récemment publié une excellente revue des études disponibles et des connaissances génétiques actuelles sur la SHBG et le métabolisme énergétique <sup>305</sup>. Il existe en effet des polymorphismes génétiques du gène de *SHBG* qui sont associés aux taux circulants de SHBG et au risque de survenue d'un diabète de type II <sup>300, 306, 307</sup>. Plus que simplement le diabète, la baisse de SHBG semble être associée aux états d'insulinorésistance comme le syndrome métabolique dès l'adolescence <sup>308, 309, 310, 311</sup>, les hyperandrogénismes <sup>312, 313, 314, 315</sup>, la stéatose hépatique <sup>316</sup> et le diabète gestationnel <sup>317</sup>. Une des questions est de savoir si la SHBG sérique est un marqueur d'insulinorésistance qui prédit le risque de survenue du diabète ou si le SHBG est elle-même directement impliquée dans la physiopathologie du diabète et des différents états d'insulinorésistance comme le syndrome des ovaires polykystiques et le syndrome métabolique <sup>305</sup>. À la vue de ces résultats et des données émergentes avec l'ostéocalcine, il pourrait être tout à fait pertinent d'analyser les interactions entre ces deux systèmes endocriniens, SHBG et ostéocalcine, tous deux négativement associés à une insulinorésistance <sup>318</sup>. Pour l'instant, les données disponibles corréler plus la SHBG avec l'insulinorésistance et la graisse périphérique qu'avec une baisse de sécrétion d'insuline ce qui en ferait un mécanisme complémentaire à l'action de l'ostéocalcine.

## **Conclusions de thèse**

L'arrivée des souris transgéniques a ouvert une ère nouvelle pour la physiologie intégrative avec la possibilité d'étudier la fonction d'un gène au sein d'un organisme vivant. De véritables révolutions dans nos connaissances physiologiques ont ainsi été rendues possibles. C'est tout particulièrement le cas au niveau osseux avec la découverte du rôle, jusqu'alors insoupçonné, de l'os sur le métabolisme énergétique et la fertilité.

Sur les recommandations du Pr Pierre Delmas, j'ai passé 2 ans dans le laboratoire de génétique osseuse du Pr Gérard Karsenty à Columbia University, New-York USA pour apprendre la physiologie intégrative. A mon retour, sous la direction du Pr Roland Chapurlat (Université de Lyon – INSERM U1033), j'ai pu continuer à travailler en lien étroit avec le Pr Karsenty et participer au transfert chez l'homme de cette nouvelle endocrinologie osseuse. Dans cette thèse je présente les avancées fondamentales les plus récentes auxquelles j'ai eu la chance de participer aux Etats-Unis et les premiers transferts à l'homme.

La première partie synthétise le contrôle neurologique de la masse osseuse. Elle présente comment la leptine agit dans le tronc cérébral en freinant les neurones sérotoninergiques qui projettent sur l'hypothalamus pour contrôler la masse osseuse (noyau du VMH) et l'appétit (noyau arqué). La sérotonine cérébrale abaisse le tonus sympathique et stimule la masse osseuse.<sup>1</sup>

La seconde partie présente la régulation osseuse du métabolisme énergétique avec la description d'une nouvelle hormone protéique, l'ostéocalcine, qui est sécrétée par l'ostéoblaste. Celle-ci stimule la production d'insuline par le pancréas, la prolifération des cellules  $\beta$  pancréatiques et diminue l'insulinorésistance périphérique<sup>2</sup>. Avec l'étude OSMID, menée en collaboration avec le Service d'Orthopédie du Pr Carret (Hospices Civils de Lyon) et du Dr Lee (Columbia University), nous apportons la première démonstration directe chez l'homme de l'action de l'ostéocalcine sur la glycémie, suggérant que l'ostéome ostéoïde est un adénome bénin sécrétant de l'ostéocalcine<sup>3</sup>. Par ailleurs, avec le Dr Szulc (Inserm U1033), dans une analyse transversale de la cohorte d'hommes âgés MINOS, nous montrons que l'ostéocalcine est négativement corrélée, en régression logistique, à la glycémie, au syndrome métabolique et à l'existence de calcifications aortiques abdominales indépendamment des autres marqueurs osseux. Ces résultats suggèrent que l'ostéocalcine pourrait être un nouveau facteur de risque cardiovasculaire<sup>4</sup>.

La troisième partie concerne les relations entre l'os et les hormones sexuelles. D'abord, fruit d'une collaboration avec le Dr Fontana (Inserm U1033) et le Dr Guastalla (Centre Léon Bérard, Lyon), nous présentons la perte osseuse observée à 1 an à la suite d'une castration chimique par anti-aromatase dans une cohorte de patientes ménopausées traitées en adjuvant pour un cancer du sein hormonodépendant<sup>5</sup>. Ensuite, dans la lignée du travail sur le métabolisme

énergétique, en partenariat avec le Dr Plotton et le Pr Lejeune (Médecine de la Reproduction, Hospices Civils de Lyon), nous avons identifié, parmi des patients présentant un hypogonadisme périphérique sévère avec oligospermie, un patient avec un syndrome métabolique dont le séquençage du gène GPRC6A du récepteur de l'ostéocalcine par l'équipe du Pr Karsenty a montré une mutation F464Y. Ils ont pu démontrer qu'il s'agissait d'une mutation dominante négative responsable d'une absence d'expression du récepteur à la membrane cellulaire établissant ainsi pour la première fois chez l'homme l'action de l'ostéocalcine sur la testostérone et la fertilité. Ils ont également caractérisé l'existence d'un nouvel axe « pancréas(insuline)-os(ostéocalcine)-testicule (testostérone) » régulant la fertilité indépendamment de l'axe hypothalamo-hypophysaire<sup>6</sup>.

1. Yadav VK, Oury F, Suda N, Liu ZW, Gao XB, **Confavreux CB**, Klemenhagen KC, Tanaka KF, Gingrich JA, Guo XE, Tecott LH, Mann JJ, Hen R, Horvath TL & Karsenty G. A serotonin-dependent mechanism explains the leptin regulation of bone mass, appetite, and energy expenditure. *Cell* 2009 138 976-989.
2. Lee NK, Sowa H, Hinoi E, Ferron M, Ahn JD, **Confavreux CB**, Dacquin R, Mee PJ, McKee MD, Jung DY, Zhang Z, Kim JK, Mauvais-Jarvis F, Ducy P & Karsenty G. Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton. *Cell* 2007 130 456-469.
3. **Confavreux CB**, Borel O, Lee F, Vaz G, Guyard M, Fadat C, Carlier MC, Chapurlat R & Karsenty G. Osteoid osteoma is an osteocalcinoma affecting glucose metabolism. *Osteoporos Int* 2011.
4. **Confavreux CB**, Szulc P, Boutroy S, Varennes A, Vilayphiou N, Goudable J & Chapurlat R. Serum osteocalcin is associated with metabolic syndrome and abdominal aortic calcifications in older men: the MINOS Study. *Soumis*.
5. **Confavreux CB**, Fontana A, Guastalla JP, Munoz F, Brun J & Delmas PD. Estrogen-dependent increase in bone turnover and bone loss in postmenopausal women with breast cancer treated with anastrozole. Prevention with bisphosphonates. *Bone* 2007 41 346-352.
6. Oury F, Ferron M, Xu L, **Confavreux CB**, Srinivas P, Lacombe J, Huizhen W, Lugani F, Lejeune H, Kumar TR, Plotton I & Karsenty G. Evidence for a novel pancreas-bone-testis axis favoring male fertility. *Soumis*.

# **Annexes**



Contents lists available at ScienceDirect

## Molecular and Cellular Endocrinology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/mce](http://www.elsevier.com/locate/mce)

## Review

## A paradigm of integrative physiology, the crosstalk between bone and energy metabolisms

Cyrille B. Confavreux<sup>a,b,\*</sup>, Robert L. Levine<sup>a,c</sup>, Gerard Karsenty<sup>a</sup><sup>a</sup> Department of Genetics and Development, College of Physicians and Surgeons, Columbia University, New York, NY 10032, USA<sup>b</sup> INSERM U831, Université de Lyon, Hospices Civils de Lyon, F-69003 Lyon, France<sup>c</sup> Division of Pediatric Endocrinology, Morgan Stanley Children's Hospital of New York-Presbyterian, Columbia University Medical Center, New York, NY, USA

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 6 April 2009

Received in revised form 7 April 2009

Accepted 7 April 2009

## Keywords:

Bone

Osteocalcin

Leptin

SNS

Energy metabolism

## ABSTRACT

Thanks to integrative physiology, new relationships between organs and homeostatic functions have emerged. This approach to physiology based on a whole organism approach has allowed the bone field to make fundamental progress.

In the last decade, clinical observations and scientific evidences *in vivo* have uncovered that fat with leptin controls bone mass through brain including a hypothalamic relay and sympathetic nervous system.

The finding that energy metabolism affects bone remodelling suggested that in an endocrine perspective, a feedback loop should exist. Beside its classical functions, bone can now be considered as a true endocrine organ secreting osteocalcin, a hormone pharmacologically active on glucose and fat metabolism. Indeed osteocalcin stimulates insulin secretion and  $\beta$ -cell proliferation. Simultaneously, osteocalcin acts on adipocytes to induce *Adiponectin* which secondarily reduce insulin resistance. This cross regulation between bone and energy metabolism offers novel therapeutic targets in type 2 diabetes and osteoporosis.

© 2009 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

## Contents

1. Energy metabolism affects bone metabolism .....	22
1.1. Bone remodelling: a survival function requiring energy .....	22
1.2. Leptin is a key hormone for appetite, reproduction and bone mass .....	22
1.3. Leptin controls bone mass through a central relay .....	22
1.4. Neuronal mediation of central control of bone mass .....	23
1.5. Clinical relevance: beta-blockers reduce fracture risk .....	23
1.6. Beta 2 adrenergic signalling pathway in the osteoblast .....	23
1.7. Leptin regulation of bone resorption by SNS and CART .....	24
2. Skeleton modulates energy metabolism .....	24
2.1. <i>Esp</i> $-/-$ mice display a favourable metabolic phenotype .....	25
2.2. Co-cultures uncover that osteoblast is an endocrine cell .....	25
2.3. Osteocalcin regulates glucose handling .....	25
2.4. Osteocalcin bioactivity .....	26
2.5. Osteocalcin pharmacological activity .....	26
3. Integration of pathways: leptin inhibits insulin secretion partly through a bone relay .....	27
4. Model organisms and integrative physiology .....	27
Acknowledgments .....	28
References .....	28

\* Corresponding author at: INSERM U831, Department of Rheumatology - Pavillon F, Hôpital Edouard Herriot, 5 place d'Arsonval, F-69003 Lyon, France.  
Tel: +33 4 72 11 74 55; fax: +33 4 72 11 74 83.

E-mail address: [cyril.confavreux@inserm.fr](mailto:cyril.confavreux@inserm.fr) (C.B. Confavreux).

action protectrice de l'autophagie en cas de toxicité secondaire à l'inhibition du protéasome est due à une élimination accrue des protéines et non pas à une augmentation de la clairance des mitochondries (éliminant ainsi la libération de molécules pro-apoptotiques).

### Perspectives : stimuler l'autophagie pour éviter la neurodégénérescence

Chez l'homme l'autophagie induite dans les maladies neurodégénératives n'est malheureusement pas suffisante pour assurer l'élimination totale des agrégats. Alors pourquoi ne pas administrer un agent stimulateur de l'autophagie dès l'apparition des premiers symptômes chez les patients atteints de la maladie de Parkinson ou d'Alzheimer ? Une telle stratégie neuroprotectrice peut paraître séduisante mais il faut prendre en considération qu'une stimulation exces-

sive de l'autophagie peut aussi entraîner la mort de la cellule, nommée mort cellulaire de type II ou autophagique. En effet, une activation excessive de l'autophagie visant à éliminer les agrégats de protéines anormales pourrait aboutir à une dégradation incontrôlée affectant des composants cellulaires essentiels à la survie cellulaire. ♦

### Autophagy as a proteasomal substitute

#### REMERCIEMENTS

Le travail de notre laboratoire sur l'autophagie est soutenu par le subside 3100A0-113925 du Fonds national suisse.

#### RÉFÉRENCES

1. Andermarcher E, Bossis G, Farras R, et al. La dégradation protéasomique : de l'adressage des protéines aux nouvelles perspectives thérapeutiques. *Med Sci (Paris)* 2005 ; 21 : 141-9.
2. Pickart CM. Back to the future with ubiquitin. *Cell* 2004 ; 116 : 181-90.
3. Codogno P. Les gènes ATG et la macro-autophagie. *Med Sci (Paris)* 2004 ; 20 : 734-6.
4. Klionsky DJ, Emr SD. Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science* 2000 ; 290 : 1717-21.
5. Ross CA, Poirier MA. Protein aggregation and neurodegenerative disease. *Nat Med* 2004 ; 10 (suppl) : S10-7.
6. Hara T, Nakamura K, Matsui M, et al. Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature* 2006 ; 441 : 885-9.
7. Komatsu M, Waguri S, Chiba T, et al. Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature* 2006 ; 441 : 880-4.
8. Pankiv S, Clausen TH, Lamark T, et al. p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *J Biol Chem* 2007 ; 282 : 24131-45.
9. Rubinsztein DC. The roles of intracellular protein-degradation pathways in neurodegeneration. *Nature* 2006 ; 443 : 780-4.
10. Pandey UB, Nie Z, Batlevi Y, et al. HDAC6 rescues neurodegeneration and provides an essential link between autophagy and the UPS. *Nature* 2007 ; 447 : 859-63.

## NOUVELLE

### Le diabète est tombé sur un os...

Cyrille B. Confavreux, Mathieu Ferron

HHSC 1614, Department of Genetics and Development, Columbia University, New York, NY 10032 États-Unis. [cc2794@columbia.edu](mailto:cc2794@columbia.edu)

► Outre ses fonctions mécaniques et son rôle dans l'homéostasie du calcium, le tissu osseux sécrète une hormone, l'ostéocalcine, impliquée dans la régulation du métabolisme énergétique [1].

Que l'obésité protège de l'ostéoporose et que l'anorexie la favorise suggère depuis longtemps l'existence d'un lien entre les métabolismes osseux et énergétique. De même, les souris ob/ob qui sont hyperphagiques et obèses par absence de leptine, hormone sécrétée par les adipocytes, ont une masse osseuse élevée [2, 3]. Une première série d'expériences a démontré que la leptine stimulait le système nerveux sympathique via les neurones hypothalamiques et freinait l'activité des ostéoblastes, cellules responsables de la formation

osseuse et exprimant des récepteurs  $\beta$ 2-adrénériques [4]. Cette découverte de la régulation centrale de la masse osseuse a



établi l'existence d'un lien hormonal entre tissu adipeux et tissu osseux [5]. Comme la physiologie endocrinienne repose sur l'existence de boucles de rétrocontrôle, ces résultats suggéraient que les ostéoblastes pouvaient, à leur tour, sécréter des molécules régulant le métabolisme énergétique. La recherche de telles hormones a reposé sur une approche génétique. Très peu de gènes sont spécifiquement exprimés dans les ostéoblastes. L'un d'eux, *Esp* (*Ptprv*), code pour une phosphatase exprimée uniquement dans les ostéoblastes et les cellules de Sertoli. Sa fonction a été étudiée chez la souris après l'inactivation du gène soit dans toutes les cellules soit ciblée seulement dans les ostéoblastes [6].



## Open

# Bone: from a reservoir of minerals to a regulator of energy metabolism

Cyrille B. Confavreux<sup>1</sup><sup>1</sup>INSERM U 1033-Université de Lyon, Department of Rheumatology, Hôpital Edouard Herriot, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France

Besides locomotion, organ protection, and calcium-phosphorus homeostasis, the three classical functions of the skeleton, bone remodeling affects energy metabolism through uncarboxylated osteocalcin, a recently discovered hormone secreted by osteoblasts. This review traces how energy metabolism affects osteoblasts through the central control of bone mass involving leptin, serotonergic neurons, the hypothalamus, and the sympathetic nervous system. Next, the role of osteocalcin (insulin secretion, insulin sensitivity, and pancreas  $\beta$ -cell proliferation) in the regulation of energy metabolism is described. Then, the connections between insulin signaling on osteoblasts and the release of uncarboxylated osteocalcin during osteoclast bone resorption through osteoprotegerin are reported. Finally, the understanding of this new bone endocrinology will provide some insights into bone, kidney, and energy metabolism in patients with chronic kidney disease.

*Kidney International* advance online publication, 23 February 2011;  
doi:10.1038/ki.2011.25

KEYWORDS: blood glucose; bone; energy metabolism; fibroblast growth factor-23; leptin; serotonin; osteocalcin

TO CITE THIS ARTICLE:

Confavreux CB. Bone: from a reservoir of minerals to a regulator of energy metabolism. *Kidney Int* 2011; **79** (Suppl 121): SX-SX.

The three classical functions of bone are locomotion, organ protection such as the skull, and calcium-phosphorus homeostasis. Locomotion has been critical for survival throughout evolution. Indeed, maintaining an excellent bone quality with good biomechanical properties is essential for locomotion and fracture prevention. To achieve this goal, bone tissue is constantly renewing itself through a physiological process called 'bone remodeling', which repairs microdamage and participates in fracture healing. Bone remodeling involves specialized cells, starting with osteoclasts, which resorb preexisting bone. The osteoclasts then leave the lacunae, and osteoblasts deposit bone matrix that is secondarily mineralized to fill the lacunae. In healthy adults, bone remodeling is well balanced and can be seen as a true homeostatic function. With aging, major physiological functions including bone maintenance are altered. Osteoporosis, a major age-related disease, is characterized by unbalanced bone remodeling, low bone mass, and altered bone architecture, leading to increased susceptibility to fractures, reduced mobility, and altered quality of life. In chronic kidney diseases (CKD), bone health is also a major issue.<sup>1,2</sup> CKD-related mineral and bone disorder has been defined as the systemic disorder of mineral and bone metabolism because of CKD manifested by one or more of the following: (1) abnormalities of calcium, phosphorus, parathyroid hormone, or vitamin D metabolism; (2) abnormalities in bone turnover, mineralization, volume, linear growth, or strength; (3) and vascular or other soft tissue calcifications.<sup>1</sup>

Bone remodeling is an active process that requires a large energy input. This led to the hypothesis of Karsenty *et al.*<sup>3</sup> that states that energy metabolism may regulate bone remodeling. This hypothesis was supported by the following clinical facts: obesity protects from osteoporosis, low body mass index increases fracture risk, and osteoporosis develops in patients with hypogonadism (for example, postmenopausal women, senior men, chemical castration). These observations suggest that appetite, reproduction, and bone might be regulated by a common hormonal system. From an endocrine viewpoint, if energy metabolism is able to regulate bone remodeling, there must be a feedback loop, and bone remodeling should affect energy metabolism. In the last few years, our understanding of these processes has developed greatly. This article will trace the course of development of our understanding of this new bone endocrinology.

Correspondence: Cyrille B. Confavreux, INSERM U 1033 et Service de Rhumatologie, Pavillon F, Hôpital Edouard Herriot, 5 Place d'Arsonval, Lyon 69003, France. E-mail: cyril.confavreux@inserm.fr



Disponible en ligne sur  
 ScienceDirect  
 www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France  
  
 www.em-consulte.com



## Éditorial

# Interactions entre tissu osseux et métabolisme énergétique<sup>☆</sup>

### Mots clés :

Ostéocalcine  
 Métabolisme énergétique  
 Leptine  
 Sérotonine  
 ATF4

## 1. Introduction

Les fonctions classiques de l'os sont homéostatiques pour la régulation phosphocalcique et mécanique à travers la locomotion et la protection d'organes nobles comme le cerveau et la moelle épinière. Récemment une nouvelle fonction endocrinienne de régulation du métabolisme énergétique a été mise à jour par G. Karsenty et son équipe à l'aide de modèles de souris transgéniques. L'hypothèse est née de la clinique constatant qu'une perte osseuse succède invariablement à une carence gonadique androgénique ou œstrogénique alors que l'obésité en revanche réduit le risque d'ostéoporose. Ces observations suggéraient que l'os, le métabolisme énergétique et la fertilité pourraient être régulés par un système endocrinien commun. À la lumière de cette hypothèse et cherchant un dénominateur commun entre os, reproduction et appétit, les travaux sur la leptine ont constitué une amorce décisive pour la mise à jour d'une toute nouvelle endocrinologie osseuse.

## 2. Action du métabolisme énergétique sur la masse osseuse

La leptine sécrétée par les adipocytes est une hormone qui contrôle l'appétit et la reproduction via un relais cérébral. Du point de vue osseux, il est intéressant de noter qu'au cours de l'évolution, la leptine apparaît avec le remodelage osseux et non avec l'appétit. Comme les souris déficientes en leptine (*Ob/Ob*) sont obèses et stériles, la question est de savoir si la leptine peut avoir une action osseuse. L'analyse du phénotype osseux des souris déficientes en leptine basée sur l'histomorphométrie vertébrale lombaire (L3–L4) a révélé que ces souris présentaient une augmentation de leur masse osseuse (volume osseux /volume total) liée à une augmentation de leur formation osseuse [1]. Sachant que le récepteur de la leptine est exprimé dans l'hypothalamus et le tronc cérébral, une injection de leptine en intra-cérébroventriculaire à des doses ne

franchissant pas la barrière hémato-méningée a été réalisée chez des souris déficientes en leptine (*Ob/Ob*). Dans ces conditions, la leptine corrige le phénotype osseux contrairement au sérum physiologique indiquant que la leptine agit sur l'os de façon indirecte par l'intermédiaire d'un relais cérébral. Cette dernière expérience fut la première à établir de façon univoque l'existence d'un contrôle central de la masse osseuse sans permettre pour autant de déterminer si ce contrôle s'exerce par voie hormonale ou neuronale.

L'algoneurodystrophie est une situation clinique qui offre des indices susceptibles de générer des hypothèses scientifiques. En effet, elle est caractérisée par la survenue brusque d'une déminéralisation osseuse locorégionale respectant les interlignes articulaires et prend typiquement l'allure d'une ostéoporose pommelée. Cette déminéralisation s'accompagne de signes vasomoteurs et d'hypersudation évocateurs d'un orage sympathique. Certaines publications font également état d'une amélioration des patients traités par bêtabloquants non sélectifs de type propranolol [2,3]. Par ailleurs, plusieurs études épidémiologiques de grande envergure ont étudié le lien entre l'existence d'un traitement bêtabloquant et la survenue d'une fracture. Dans ces études, les bêtabloquants réduisent significativement d'un quart le risque fracturaire de hanche avec un *odd-ratio* variant de 0,68 à 0,76 [4–6]. Ces données cliniques rejoignent celles des souris déficientes en leptine qui présentent à la fois une masse osseuse élevée et un tonus sympathique bas. Ces données ont suggéré à l'équipe de G. Karsenty que le contrôle central de la masse osseuse s'exerçait selon une voie neuronale et par l'intermédiaire du système nerveux sympathique. Afin de démontrer cette hypothèse, une expérience établissant chirurgicalement une circulation sanguine commune entre deux animaux, appelée parabiose, a été réalisée avec deux souris (*Ob/Ob*) déficientes en leptine. L'injection intra-cérébroventriculaire de leptine à l'une des souris corrige sa masse osseuse comme attendu, mais ne corrige pas la masse osseuse de sa partenaire indiquant clairement qu'il s'agit d'un contrôle neuronal [7]. Dans un second temps, le tonus sympathique des souris (*Ob/Ob*) a été corrigé en les traitant avec de l'isoproterénol, un agoniste des récepteurs bêtaadrénergiques. Après traitement, l'isoproterénol ne corrige pas l'appétit ni l'obésité, mais corrige le phénotype osseux établissant ainsi le rôle du tonus sympathique [7].

En somme, nous venons de montrer comment la leptine inhibe la formation osseuse par l'intermédiaire d'un relais cérébral et du tonus sympathique. Cela signifie que la graisse contrôle la masse osseuse, autrement dit que le métabolisme énergétique régule la masse osseuse. Dans une perspective endocrinienne, lorsqu'un système agit sur un autre, il y a nécessairement une contre régulation permettant l'équilibre. La question suivante est d'établir, s'il existe ou non, une action de l'os sur le métabolisme énergétique.

<sup>☆</sup> Ne pas utiliser, pour citation, la référence française de cet article, mais sa référence anglaise dans le même volume de Joint Bone Spine.

## Références

1. Oury F, Sumara G, Sumara O, Ferron M, Chang H, Smith CE, Hermo L, Suarez S, Roth BL, Ducy P & Karsenty G. Endocrine regulation of male fertility by the skeleton. *Cell* 2011 **144** 796-809.
2. Elefteriou F & Yang X. Genetic mouse models for bone studies--strengths and limitations. *Bone* 2011 **49** 1242-1254.
3. Karsenty G & Ferron M. The contribution of bone to whole-organism physiology. *Nature* 2012 **481** 314-320.
4. Delmas PD, Stenner DD, Romberg RW, Riggs BL & Mann KG. Immunochemical studies of conformational alterations in bone gamma-carboxyglutamic acid containing protein. *Biochemistry* 1984 **23** 4720-4725.
5. Delmas PD, Tracy RP, Riggs BL & Mann KG. Identification of the noncollagenous proteins of bovine bone by two-dimensional gel electrophoresis. *Calcif Tissue Int* 1984 **36** 308-316.
6. Delmas PD, Wahner HW, Mann KG & Riggs BL. Assessment of bone turnover in postmenopausal osteoporosis by measurement of serum bone Gla-protein. *J Lab Clin Med* 1983 **102** 470-476.
7. Poser JW, Esch FS, Ling NC & Price PA. Isolation and sequence of the vitamin K-dependent protein from human bone. Undercarboxylation of the first glutamic acid residue. *J Biol Chem* 1980 **255** 8685-8691.
8. Rhoades R PR. *Human Physiology. 3rd edition.*: Saunders College Publishing, 1996.
9. Karsenty G. Convergence between bone and energy homeostases: leptin regulation of bone mass. *Cell Metab* 2006 **4** 341-348.
10. Lee NK & Karsenty G. Reciprocal regulation of bone and energy metabolism. *Trends Endocrinol Metab* 2008 **19** 161-166.
11. Spiegelman BM & Flier JS. Adipogenesis and obesity: rounding out the big picture. *Cell* 1996 **87** 377-389.
12. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L & Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 1994 **372** 425-432.
13. Auwerx J & Staels B. Leptin. *Lancet* 1998 **351** 737-742.
14. Ducy P, Amling M, Takeda S, Priemel M, Schilling AF, Beil FT, Shen J, Vinson C, Rueger JM & Karsenty G. Leptin inhibits bone formation through a hypothalamic relay: a central control of bone mass. *Cell* 2000 **100** 197-207.
15. Bartell SM, Rayalam S, Ambati S, Gaddam DR, Hartzell DL, Hamrick M, She JX, Della-Fera MA & Baile CA. Central (ICV) leptin injection increases bone formation, bone mineral density, muscle mass, serum IGF-1, and the expression of osteogenic genes in leptin-deficient ob/ob mice. *J Bone Miner Res* 2011 **26** 1710-1720.
16. Burguera B, Hofbauer LC, Thomas T, Gori F, Evans GL, Khosla S, Riggs BL & Turner RT. Leptin reduces ovariectomy-induced bone loss in rats. *Endocrinology* 2001 **142** 3546-3553.
17. Gimble JM. Leptin's balancing act between bone and fat. *J Bone Miner Res* 2011 **26** 1694-1697.

18. Hamrick MW, Della-Fera MA, Choi YH, Pennington C, Hartzell D & Baile CA. Leptin treatment induces loss of bone marrow adipocytes and increases bone formation in leptin-deficient ob/ob mice. *J Bone Miner Res* 2005 **20** 994-1001.
19. Kajimura D, Hinoi E, Ferron M, Kode A, Riley KJ, Zhou B, Guo XE & Karsenty G. Genetic determination of the cellular basis of the sympathetic regulation of bone mass accrual. *J Exp Med* 2011 **208** 841-851.
20. Stepan CM, Crawford DT, Chidsey-Frink KL, Ke H & Swick AG. Leptin is a potent stimulator of bone growth in ob/ob mice. *Regul Pept* 2000 **92** 73-78.
21. Thomas T, Gori F, Khosla S, Jensen MD, Burguera B & Riggs BL. Leptin acts on human marrow stromal cells to enhance differentiation to osteoblasts and to inhibit differentiation to adipocytes. *Endocrinology* 1999 **140** 1630-1638.
22. Williams GA, Callon KE, Watson M, Costa JL, Ding Y, Dickinson M, Wang Y, Naot D, Reid IR & Cornish J. Skeletal phenotype of the leptin receptor-deficient db/db mouse. *J Bone Miner Res* 2011 **26** 1698-1709.
23. Friez L, Pere G, Breuillard P & Meignan S. [Comparison of treatment with griseofulvin, beta blockers and calcitonin in 55 cases of post-traumatic algoneurodystrophies]. *Rev Rhum Mal Osteoartic* 1982 **49** 857-860.
24. Simson G. Letter: Propranolol for causalgia and Sudeck's atrophy. *Jama* 1974 **227** 327.
25. Visitsunthorn U & Prete P. Reflex sympathetic dystrophy of the lower extremity: a complication of herpes zoster with dramatic response to propranolol. *West J Med* 1981 **135** 62-66.
26. Takeda S, Eleftheriou F, Lvasseur R, Liu X, Zhao L, Parker KL, Armstrong D, Ducy P & Karsenty G. Leptin regulates bone formation via the sympathetic nervous system. *Cell* 2002 **111** 305-317.
27. Hinoi E, Gao N, Jung DY, Yadav V, Yoshizawa T, Myers MG, Jr., Chua SC, Jr., Kim JK, Kaestner KH & Karsenty G. The sympathetic tone mediates leptin's inhibition of insulin secretion by modulating osteocalcin bioactivity. *J Cell Biol* 2008 **183** 1235-1242.
28. Bonnet N, Benhamou CL, Malaval L, Goncalves C, Vico L, Eder V, Pichon C & Courteix D. Low dose beta-blocker prevents ovariectomy-induced bone loss in rats without affecting heart functions. *J Cell Physiol* 2008 **217** 819-827.
29. Bonnet N, Beaupied H, Vico L, Dolleans E, Laroche N, Courteix D & Benhamou CL. Combined effects of exercise and propranolol on bone tissue in ovariectomized rats. *J Bone Miner Res* 2007 **22** 578-588.
30. Pierroz DD, Boussein ML, Rizzoli R & Ferrari SL. Combined treatment with a beta-blocker and intermittent PTH improves bone mass and microarchitecture in ovariectomized mice. *Bone* 2006 **39** 260-267.
31. Schlienger RG, Kraenzlin ME, Jick SS & Meier CR. Use of beta-blockers and risk of fractures. *Jama* 2004 **292** 1326-1332.
32. Pasco JA, Henry MJ, Sanders KM, Kotowicz MA, Seeman E & Nicholson GC. Beta-adrenergic blockers reduce the risk of fracture partly by increasing bone mineral density: Geelong Osteoporosis Study. *J Bone Miner Res* 2004 **19** 19-24.
33. Yang S, Nguyen ND, Center JR, Eisman JA & Nguyen TV. Association between beta-blocker use and fracture risk: the Dubbo Osteoporosis Epidemiology Study. *Bone* 2011 **48** 451-455.
34. Meisinger C, Heier M, Lang O & Doring A. Beta-blocker use and risk of fractures in men and women from the general population: the MONICA/KORA Augsburg cohort study. *Osteoporos Int* 2007 **18** 1189-1195.

35. de Vries F, Souverein PC, Cooper C, Leufkens HG & van Staa TP. Use of beta-blockers and the risk of hip/femur fracture in the United Kingdom and The Netherlands. *Calcif Tissue Int* 2007 **80** 69-75.
36. Perez-Castrillon JL, Vega G, Abad L, Sanz A, Mendo M, Porrero MG & Duenas A. Effect of beta-blockers on bone mass and biomechanical parameters of the femoral neck in males with acute myocardial infarction. *Joint Bone Spine* 2007 **74** 259-262.
37. Sosa M, Saavedra P, Gomez de Tejada MJ, Mosquera J, Perez-Cano R, Olmos JM, Munoz-Torres M, Amerigo MJ, Moro MJ, Diaz-Curiel M, Alegre J, Malouf J, Del Pino J, Nogues X & Torrijos A. Beta-blocker use is associated with fragility fractures in postmenopausal women with coronary heart disease. *Aging Clin Exp Res* 2011 **23** 112-117.
38. Reid IR, Lucas J, Wattie D, Horne A, Bolland M, Gamble GD, Davidson JS & Grey AB. Effects of a beta-blocker on bone turnover in normal postmenopausal women: a randomized controlled trial. *J Clin Endocrinol Metab* 2005 **90** 5212-5216.
39. Reid IR, Gamble GD, Grey AB, Black DM, Ensrud KE, Browner WS & Bauer DC. beta-Blocker use, BMD, and fractures in the study of osteoporotic fractures. *J Bone Miner Res* 2005 **20** 613-618.
40. Levasseur R, Dargent-Molina P, Sabatier JP, Marcelli C & Breart G. Beta-blocker use, bone mineral density, and fracture risk in older women: results from the Epidemiologie de l'Osteoporose prospective study. *J Am Geriatr Soc* 2005 **53** 550-552.
41. Balthasar N, Coppari R, McMinn J, Liu SM, Lee CE, Tang V, Kenny CD, McGovern RA, Chua SC, Jr., Elmquist JK & Lowell BB. Leptin receptor signaling in POMC neurons is required for normal body weight homeostasis. *Neuron* 2004 **42** 983-991.
42. Yadav VK, Oury F, Suda N, Liu ZW, Gao XB, Confavreux C, Klemenhagen KC, Tanaka KF, Gingrich JA, Guo XE, Tecott LH, Mann JJ, Hen R, Horvath TL & Karsenty G. A serotonin-dependent mechanism explains the leptin regulation of bone mass, appetite, and energy expenditure. *Cell* 2009 **138** 976-989.
43. Mann JJ, McBride PA, Brown RP, Linnoila M, Leon AC, DeMeo M, Mieczkowski T, Myers JE & Stanley M. Relationship between central and peripheral serotonin indexes in depressed and suicidal psychiatric inpatients. *Arch Gen Psychiatry* 1992 **49** 442-446.
44. Srinivasan S, Sadegh L, Elle IC, Christensen AG, Faergeman NJ & Ashrafi K. Serotonin regulates *C. elegans* fat and feeding through independent molecular mechanisms. *Cell Metab* 2008 **7** 533-544.
45. Heath MJ & Hen R. Serotonin receptors. Genetic insights into serotonin function. *Curr Biol* 1995 **5** 997-999.
46. Yadav VK, Ryu JH, Suda N, Tanaka KF, Gingrich JA, Schutz G, Glorieux FH, Chiang CY, Zajac JD, Insogna KL, Mann JJ, Hen R, Ducy P & Karsenty G. Lrp5 controls bone formation by inhibiting serotonin synthesis in the duodenum. *Cell* 2008 **135** 825-837.
47. Walther DJ, Peter JU, Bashammakh S, Hortnagl H, Voits M, Fink H & Bader M. Synthesis of serotonin by a second tryptophan hydroxylase isoform. *Science* 2003 **299** 76.
48. Ye Z, Chen L, Yang Z, Li Q, Huang Y, He M, Zhang S, Zhang Z, Wang X, Zhao W, Hu J, Liu C, Qu S & Hu R. Metabolic effects of fluoxetine in adults

- with type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis of randomized placebo-controlled trials. *PLoS One* 2011 **6** e21551.
49. Diem SJ, Blackwell TL, Stone KL, Yaffe K, Haney EM, Blizotes MM & Ensrud KE. Use of antidepressants and rates of hip bone loss in older women: the study of osteoporotic fractures. *Arch Intern Med* 2007 **167** 1240-1245.
  50. Haney EM, Chan BK, Diem SJ, Ensrud KE, Cauley JA, Barrett-Connor E, Orwoll E & Blizotes MM. Association of low bone mineral density with selective serotonin reuptake inhibitor use by older men. *Arch Intern Med* 2007 **167** 1246-1251.
  51. Richards JB, Papaioannou A, Adachi JD, Joseph L, Whitson HE, Prior JC & Goltzman D. Effect of selective serotonin reuptake inhibitors on the risk of fracture. *Arch Intern Med* 2007 **167** 188-194.
  52. Williams LJ, Henry MJ, Berk M, Dodd S, Jacka FN, Kotowicz MA, Nicholson GC & Pasco JA. Selective serotonin reuptake inhibitor use and bone mineral density in women with a history of depression. *Int Clin Psychopharmacol* 2008 **23** 84-87.
  53. Kinjo M, Setoguchi S, Schneeweiss S & Solomon DH. Bone mineral density in subjects using central nervous system-active medications. *Am J Med* 2005 **118** 1414.
  54. Spangler L, Scholes D, Brunner RL, Robbins J, Reed SD, Newton KM, Melville JL & Lacroix AZ. Depressive symptoms, bone loss, and fractures in postmenopausal women. *J Gen Intern Med* 2008 **23** 567-574.
  55. Lewis CE, Ewing SK, Taylor BC, Shikany JM, Fink HA, Ensrud KE, Barrett-Connor E, Cummings SR & Orwoll E. Predictors of non-spine fracture in elderly men: the MrOS study. *J Bone Miner Res* 2007 **22** 211-219.
  56. Ziere G, Dieleman JP, van der Cammen TJ, Hofman A, Pols HA & Stricker BH. Selective serotonin reuptake inhibiting antidepressants are associated with an increased risk of nonvertebral fractures. *J Clin Psychopharmacol* 2008 **28** 411-417.
  57. Vestergaard P, Rejnmark L & Mosekilde L. Anxiolytics, sedatives, antidepressants, neuroleptics and the risk of fracture. *Osteoporos Int* 2006 **17** 807-816.
  58. Bolton JM, Metge C, Lix L, Prior H, Sareen J & Leslie WD. Fracture risk from psychotropic medications: a population-based analysis. *J Clin Psychopharmacol* 2008 **28** 384-391.
  59. Liu B, Anderson G, Mittmann N, To T, Axcell T & Shear N. Use of selective serotonin-reuptake inhibitors or tricyclic antidepressants and risk of hip fractures in elderly people. *Lancet* 1998 **351** 1303-1307.
  60. Ray WA, Griffin MR, Schaffner W, Baugh DK & Melton LJ, 3rd. Psychotropic drug use and the risk of hip fracture. *N Engl J Med* 1987 **316** 363-369.
  61. Richelson E. Pharmacology of antidepressants. *Mayo Clin Proc* 2001 **76** 511-527.
  62. Haney EM, Warden SJ & Blizotes MM. Effects of selective serotonin reuptake inhibitors on bone health in adults: time for recommendations about screening, prevention and management? *Bone* 2010 **46** 13-17.
  63. Blizotes MM, Eshleman AJ, Zhang XW & Wiren KM. Neurotransmitter action in osteoblasts: expression of a functional system for serotonin receptor activation and reuptake. *Bone* 2001 **29** 477-486.
  64. Eleftheriou F, Takeda S, Ebihara K, Magre J, Patano N, Kim CA, Ogawa Y, Liu X, Ware SM, Craigen WJ, Robert JJ, Vinson C, Nakao K, Capeau J &

- Karsenty G. Serum leptin level is a regulator of bone mass. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004 **101** 3258-3263.
65. Hess R, Pino AM, Rios S, Fernandez M & Rodriguez JP. High affinity leptin receptors are present in human mesenchymal stem cells (MSCs) derived from control and osteoporotic donors. *J Cell Biochem* 2005 **94** 50-57.
  66. Khosla S. Leptin-central or peripheral to the regulation of bone metabolism? *Endocrinology* 2002 **143** 4161-4164.
  67. Martin A, David V, Vico L & Thomas T. Impaired energetic metabolism after central leptin signaling leads to massive appendicular bone loss in hindlimb-suspended rats. *J Bone Miner Res* 2008 **23** 2040-2047.
  68. Martin A, de Vittoris R, David V, Moraes R, Begeot M, Lafage-Proust MH, Alexandre C, Vico L & Thomas T. Leptin modulates both resorption and formation while preventing disuse-induced bone loss in tail-suspended female rats. *Endocrinology* 2005 **146** 3652-3659.
  69. Scheller EL, Song J, Dishowitz MI, Soki FN, Hankenson KD & Krebsbach PH. Leptin functions peripherally to regulate differentiation of mesenchymal progenitor cells. *Stem Cells* 2010 **28** 1071-1080.
  70. Shi Y, Yadav VK, Suda N, Liu XS, Guo XE, Myers MG, Jr. & Karsenty G. Dissociation of the neuronal regulation of bone mass and energy metabolism by leptin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008 **105** 20529-20533.
  71. Elefteriou F, Ahn JD, Takeda S, Starbuck M, Yang X, Liu X, Kondo H, Richards WG, Bannon TW, Noda M, Clement K, Vaisse C & Karsenty G. Leptin regulation of bone resorption by the sympathetic nervous system and CART. *Nature* 2005 **434** 514-520.
  72. Singh MK, Elefteriou F & Karsenty G. Cocaine and amphetamine-regulated transcript may regulate bone remodeling as a circulating molecule. *Endocrinology* 2008 **149** 3933-3941.
  73. Fu L, Patel MS, Bradley A, Wagner EF & Karsenty G. The molecular clock mediates leptin-regulated bone formation. *Cell* 2005 **122** 803-815.
  74. Datta NS & Abou-Samra AB. PTH and PTHrP signaling in osteoblasts. *Cell Signal* 2009 **21** 1245-1254.
  75. Yoshizawa T, Hinoi E, Jung DY, Kajimura D, Ferron M, Seo J, Graff JM, Kim JK & Karsenty G. The transcription factor ATF4 regulates glucose metabolism in mice through its expression in osteoblasts. *J Clin Invest* 2009 **119** 2807-2817.
  76. Caulfield MP. Muscarinic receptors--characterization, coupling and function. *Pharmacol Ther* 1993 **58** 319-379.
  77. Wess J. Molecular biology of muscarinic acetylcholine receptors. *Crit Rev Neurobiol* 1996 **10** 69-99.
  78. Buckley NJ, Bonner TI & Brann MR. Localization of a family of muscarinic receptor mRNAs in rat brain. *J Neurosci* 1988 **8** 4646-4652.
  79. Shi Y, Oury F, Yadav VK, Wess J, Liu XS, Guo XE, Murshed M & Karsenty G. Signaling through the M(3) muscarinic receptor favors bone mass accrual by decreasing sympathetic activity. *Cell Metab* 2010 **11** 231-238.
  80. Confavreux CB, Levine RL & Karsenty G. A paradigm of integrative physiology, the crosstalk between bone and energy metabolisms. *Mol Cell Endocrinol* 2009 **310** 21-29.
  81. Harada S & Rodan GA. Control of osteoblast function and regulation of bone mass. *Nature* 2003 **423** 349-355.

82. Rodan GA & Martin TJ. Therapeutic approaches to bone diseases. *Science* 2000 **289** 1508-1514.
83. Teitelbaum SL. Bone resorption by osteoclasts. *Science* 2000 **289** 1504-1508.
84. Lee NK, Sowa H, Hinoi E, Ferron M, Ahn JD, Confavreux C, Dacquin R, Mee PJ, McKee MD, Jung DY, Zhang Z, Kim JK, Mauvais-Jarvis F, Ducy P & Karsenty G. Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton. *Cell* 2007 **130** 456-469.
85. Ducy P, Desbois C, Boyce B, Pinero G, Story B, Dunstan C, Smith E, Bonadio J, Goldstein S, Gundberg C, Bradley A & Karsenty G. Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice. *Nature* 1996 **382** 448-452.
86. Confavreux CB & Ferron M. [Diabetes is buried under a bone]. *Med Sci (Paris)* 2008 **24** 21-23.
87. Delmas PD, Wilson DM, Mann KG & Riggs BL. Effect of renal function on plasma levels of bone Gla-protein. *J Clin Endocrinol Metab* 1983 **57** 1028-1030.
88. Iwamoto J, Seki A, Sato Y, Matsumoto H, Takeda T & Yeh JK. Vitamin K prevents hyperglycemia and cancellous osteopenia in rats with streptozotocin-induced type 1 diabetes. *Calcif Tissue Int* 2011 **88** 162-168.
89. Ferron M, Wei J, Yoshizawa T, Del Fattore A, DePinho RA, Teti A, Ducy P & Karsenty G. Insulin signaling in osteoblasts integrates bone remodeling and energy metabolism. *Cell* 2010 **142** 296-308.
90. Confavreux CB. Interactions between bone tissue and energy metabolism. *Joint Bone Spine* 2010 **77** 287-289.
91. Fulzele K, Riddle RC, DiGirolamo DJ, Cao X, Wan C, Chen D, Faugere MC, Aja S, Hussain MA, Bruning JC & Clemens TL. Insulin receptor signaling in osteoblasts regulates postnatal bone acquisition and body composition. *Cell* 2010 **142** 309-319.
92. Rached MT, Kode A, Silva BC, Jung DY, Gray S, Ong H, Paik JH, DePinho RA, Kim JK, Karsenty G & Kousteni S. FoxO1 expression in osteoblasts regulates glucose homeostasis through regulation of osteocalcin in mice. *J Clin Invest* 2010 **120** 357-368.
93. Ferron M, Hinoi E, Karsenty G & Ducy P. Osteocalcin differentially regulates beta cell and adipocyte gene expression and affects the development of metabolic diseases in wild-type mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008 **105** 5266-5270.
94. Ferron M, McKee MD, Levine RL, Ducy P & Karsenty G. Intermittent injections of osteocalcin improve glucose metabolism and prevent type 2 diabetes in mice. *Bone* 2011.
95. Covey SD, Wideman RD, McDonald C, Unniappan S, Huynh F, Asadi A, Speck M, Webber T, Chua SC & Kieffer TJ. The pancreatic beta cell is a key site for mediating the effects of leptin on glucose homeostasis. *Cell Metab* 2006 **4** 291-302.
96. Morioka T, Asilmaz E, Hu J, Dishinger JF, Kurpad AJ, Elias CF, Li H, Elmquist JK, Kennedy RT & Kulkarni RN. Disruption of leptin receptor expression in the pancreas directly affects beta cell growth and function in mice. *J Clin Invest* 2007 **117** 2860-2868.
97. Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL & Karsenty G. *Osf2/Cbfa1*: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell* 1997 **89** 747-754.
98. Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, Zhang Z, Deng JM, Behringer RR & de Crombrughe B. The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is

- required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell* 2002 **108** 17-29.
99. Yang X & Karsenty G. ATF4, the osteoblast accumulation of which is determined post-translationally, can induce osteoblast-specific gene expression in non-osteoblastic cells. *J Biol Chem* 2004 **279** 47109-47114.
  100. Yang X, Matsuda K, Bialek P, Jacquot S, Masuoka HC, Schinke T, Li L, Brancorsini S, Sassone-Corsi P, Townes TM, Hanauer A & Karsenty G. ATF4 is a substrate of RSK2 and an essential regulator of osteoblast biology; implication for Coffin-Lowry Syndrome. *Cell* 2004 **117** 387-398.
  101. Yoshikawa Y, Kode A, Xu L, Mosialou I, Silva BC, Ferron M, Clemens TL, Economides AN & Kousteni S. Genetic evidence points to an osteocalcin-independent influence of osteoblasts on energy metabolism. *J Bone Miner Res* 2011 **26** 2012-2025.
  102. Wencker D, Chandra M, Nguyen K, Miao W, Garantziotis S, Factor SM, Shirani J, Armstrong RC & Kitsis RN. A mechanistic role for cardiac myocyte apoptosis in heart failure. *J Clin Invest* 2003 **111** 1497-1504.
  103. Pajvani UB, Trujillo ME, Combs TP, Iyengar P, Jelicks L, Roth KA, Kitsis RN & Scherer PE. Fat apoptosis through targeted activation of caspase 8: a new mouse model of inducible and reversible lipodystrophy. *Nat Med* 2005 **11** 797-803.
  104. Salomon B, Lores P, Pioche C, Racz P, Jami J & Klatzmann D. Conditional ablation of dendritic cells in transgenic mice. *J Immunol* 1994 **152** 537-548.
  105. Rosato MT, Schneider SH & Shapses SA. Bone turnover and insulin-like growth factor I levels increase after improved glycemic control in noninsulin-dependent diabetes mellitus. *Calcif Tissue Int* 1998 **63** 107-111.
  106. Confavreux CB. Bone: from a reservoir of minerals to a regulator of energy metabolism. *Kidney Int Suppl* 2011 S14-19.
  107. Confavreux CB, Borel O, Lee F, Vaz G, Guyard M, Fadat C, Carlier MC, Chapurlat R & Karsenty G. Osteoid osteoma is an osteocalcinoma affecting glucose metabolism. *Osteoporos Int* 2011.
  108. Kohler R, Rubini J, Postec F, Canterino I & Archimbaud F. [Treatment of osteoid osteoma by CT-controlled percutaneous drill resection. Apropos of 27 cases]. *Rev Chir Orthop Reparatrice Appar Mot* 1995 **81** 317-325.
  109. Bilezikian JP, Raisz LG & Martin TJ, Eds. *Principles of Bone Biology*. London: Academic Press - Elsevier, 2008.
  110. Ducy P, Starbuck M, Priemel M, Shen J, Pinero G, Geoffroy V, Amling M & Karsenty G. A Cbfa1-dependent genetic pathway controls bone formation beyond embryonic development. *Genes Dev* 1999 **13** 1025-1036.
  111. Komori T, Yagi H, Nomura S, Yamaguchi A, Sasaki K, Deguchi K, Shimizu Y, Bronson RT, Gao YH, Inada M, Sato M, Okamoto R, Kitamura Y, Yoshiki S & Kishimoto T. Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell* 1997 **89** 755-764.
  112. Lee B, Thirunavukkarasu K, Zhou L, Pastore L, Baldini A, Hecht J, Geoffroy V, Ducy P & Karsenty G. Missense mutations abolishing DNA binding of the osteoblast-specific transcription factor OSF2/CBFA1 in cleidocranial dysplasia. *Nat Genet* 1997 **16** 307-310.
  113. Mundlos S, Otto F, Mundlos C, Mulliken JB, Aylsworth AS, Albright S, Lindhout D, Cole WG, Henn W, Knoll JH, Owen MJ, Mertelsmann R, Zabel BU & Olsen BR. Mutations involving the transcription factor CBFA1 cause cleidocranial dysplasia. *Cell* 1997 **89** 773-779.

114. Otto F, Thornell AP, Crompton T, Denzel A, Gilmour KC, Rosewell IR, Stamp GW, Beddington RS, Mundlos S, Olsen BR, Selby PB & Owen MJ. Cbfa1, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell* 1997 **89** 765-771.
115. Kerner SA, Scott RA & Pike JW. Sequence elements in the human osteocalcin gene confer basal activation and inducible response to hormonal vitamin D3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989 **86** 4455-4459.
116. Montecino M, Stein GS, Cruzat F, Marcellini S, Stein JL, Lian JB, van Wijnen AJ & Arriagada G. An architectural perspective of vitamin D responsiveness. *Arch Biochem Biophys* 2007 **460** 293-299.
117. Hauschka PV, Lian JB, Cole DE & Gundberg CM. Osteocalcin and matrix Gla protein: vitamin K-dependent proteins in bone. *Physiol Rev* 1989 **69** 990-1047.
118. Lee AJ, Hodges S & Eastell R. Measurement of osteocalcin. *Ann Clin Biochem* 2000 **37** ( Pt 4) 432-446.
119. Tsuchida T, Ishimura E, Miki T, Matsumoto N, Naka H, Jono S, Inaba M & Nishizawa Y. The clinical significance of serum osteocalcin and N-terminal propeptide of type I collagen in predialysis patients with chronic renal failure. *Osteoporos Int* 2005 **16** 172-179.
120. Gundberg CM, Markowitz ME, Mizruchi M & Rosen JF. Osteocalcin in human serum: a circadian rhythm. *J Clin Endocrinol Metab* 1985 **60** 736-739.
121. Douglas AS, Miller MH, Reid DM, Hutchison JD, Porter RW & Robins SP. Seasonal differences in biochemical parameters of bone remodelling. *J Clin Pathol* 1996 **49** 284-289.
122. Thomsen K, Eriksen EF, Jorgensen JC, Charles P & Mosekilde L. Seasonal variation of serum bone GLA protein. *Scand J Clin Lab Invest* 1989 **49** 605-611.
123. Woitge HW, Scheidt-Nave C, Kissling C, Leidig-Bruckner G, Meyer K, Grauer A, Scharla SH, Ziegler R & Seibel MJ. Seasonal variation of biochemical indexes of bone turnover: results of a population-based study. *J Clin Endocrinol Metab* 1998 **83** 68-75.
124. Nielsen HK, Brixen K, Bouillon R & Mosekilde L. Changes in biochemical markers of osteoblastic activity during the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 1990 **70** 1431-1437.
125. Vanderschueren D, Gevers G, Raymaekers G, Devos P & Dequeker J. Sex- and age-related changes in bone and serum osteocalcin. *Calcif Tissue Int* 1990 **46** 179-182.
126. Rodin A, Duncan A, Quartero HW, Pistofidis G, Mashiter G, Whitaker K, Crook D, Stevenson JC, Chapman MG & Fogelman I. Serum concentrations of alkaline phosphatase isoenzymes and osteocalcin in normal pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 1989 **68** 1123-1127.
127. Obrant KJ, Merle B, Bejui J & Delmas PD. Serum bone-gla protein after fracture. *Clin Orthop Relat Res* 1990 300-303.
128. Garnerio P, Vassy V, Bertholin A, Riou JP & Delmas PD. Markers of bone turnover in hyperthyroidism and the effects of treatment. *J Clin Endocrinol Metab* 1994 **78** 955-959.
129. Martinez ME, Herranz L, de Pedro C & Pallardo LF. Osteocalcin levels in patients with hyper- and hypothyroidism. *Horm Metab Res* 1986 **18** 212-214.
130. Rizzoli R, Poser J & Burgi U. Nuclear thyroid hormone receptors in cultured bone cells. *Metabolism* 1986 **35** 71-74.

131. Sato K, Han DC, Fujii Y, Tsushima T & Shizume K. Thyroid hormone stimulates alkaline phosphatase activity in cultured rat osteoblastic cells (ROS 17/2.8) through 3,5,3'-triiodo-L-thyronine nuclear receptors. *Endocrinology* 1987 **120** 1873-1881.
132. Hwang YC, Jeong IK, Ahn KJ & Chung HY. The uncarboxylated form of osteocalcin is associated with improved glucose tolerance and enhanced beta-cell function in middle-aged male subjects. *Diabetes Metab Res Rev* 2009 **25** 768-772.
133. Iki M, Tamaki J, Fujita Y, Kouda K, Yura A, Kadowaki E, Sato Y, Moon JS, Tomioka K, Okamoto N & Kurumatani N. Serum undercarboxylated osteocalcin levels are inversely associated with glycemic status and insulin resistance in an elderly Japanese male population: Fujiwara-kyo Osteoporosis Risk in Men (FORMEN) Study. *Osteoporos Int* 2011.
134. Kanazawa I, Yamaguchi T, Tada Y, Yamauchi M, Yano S & Sugimoto T. Serum osteocalcin level is positively associated with insulin sensitivity and secretion in patients with type 2 diabetes. *Bone* 2011 **48** 720-725.
135. Leslie WD, Weiler HA, Lix LM & Nyomba BL. Body composition and bone density in Canadian White and Aboriginal women: the First Nations Bone Health Study. *Bone* 2008 **42** 990-995.
136. Pittas AG, Harris SS, Eliades M, Stark P & Dawson-Hughes B. Association between serum osteocalcin and markers of metabolic phenotype. *J Clin Endocrinol Metab* 2009 **94** 827-832.
137. Saleem U, Mosley TH, Jr. & Kullo IJ. Serum osteocalcin is associated with measures of insulin resistance, adipokine levels, and the presence of metabolic syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010 **30** 1474-1478.
138. Garcia-Martin A, Cortes-Berdonces M, Luque-Fernandez I, Rozas-Moreno P, Quesada-Charneco M & Munoz-Torres M. Osteocalcin as a marker of metabolic risk in healthy postmenopausal women. *Menopause* 2010.
139. Kanazawa I, Yamaguchi T, Yamamoto M, Yamauchi M, Kurioka S, Yano S & Sugimoto T. Serum osteocalcin level is associated with glucose metabolism and atherosclerosis parameters in type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 2009 **94** 45-49.
140. Kanazawa I, Yamaguchi T, Yamauchi M, Yamamoto M, Kurioka S, Yano S & Sugimoto T. Serum undercarboxylated osteocalcin was inversely associated with plasma glucose level and fat mass in type 2 diabetes mellitus. *Osteoporos Int* 2011 **22** 187-194.
141. Kindblom JM, Ohlsson C, Ljunggren O, Karlsson MK, Tivesten A, Smith U & Mellstrom D. Plasma osteocalcin is inversely related to fat mass and plasma glucose in elderly Swedish men. *J Bone Miner Res* 2009 **24** 785-791.
142. Bae SJ, Choe JW, Chung YE, Kim BJ, Lee SH, Kim HY, Koh JM, Kim HK & Kim GS. The association between serum osteocalcin levels and metabolic syndrome in Koreans. *Osteoporos Int* 2011 **22** 2837-2846.
143. Tan A, Gao Y, Yang X, Zhang H, Qin X, Mo L, Peng T, Xia N & Mo Z. Low serum osteocalcin level is a potential marker for metabolic syndrome: results from a Chinese male population survey. *Metabolism* 2011 **60** 1186-1192.
144. Yeap BB, Chubb SA, Flicker L, McCaul KA, Ebeling PR, Beilby JP & Norman PE. Reduced serum total osteocalcin is associated with metabolic syndrome in older men via waist circumference, hyperglycemia, and triglyceride levels. *Eur J Endocrinol* 2010 **163** 265-272.

145. Eckel RH, Grundy SM & Zimmet PZ. The metabolic syndrome. *Lancet* 2005 **365** 1415-1428.
146. Grundy SM. Metabolic syndrome: a multiplex cardiovascular risk factor. *J Clin Endocrinol Metab* 2007 **92** 399-404.
147. Misra A & Khurana L. Obesity and the metabolic syndrome in developing countries. *J Clin Endocrinol Metab* 2008 **93** S9-30.
148. Bindraban NR, van Valkengoed IG, Mairuhu G, Koster RW, Holleman F, Hoekstra JB, Koopmans RP & Stronks K. A new tool, a better tool? Prevalence and performance of the International Diabetes Federation and the National Cholesterol Education Program criteria for metabolic syndrome in different ethnic groups. *Eur J Epidemiol* 2008 **23** 37-44.
149. Ford ES. Prevalence of the metabolic syndrome defined by the International Diabetes Federation among adults in the U.S. *Diabetes Care* 2005 **28** 2745-2749.
150. Hu G, Qiao Q, Tuomilehto J, Balkau B, Borch-Johnsen K & Pyorala K. Prevalence of the metabolic syndrome and its relation to all-cause and cardiovascular mortality in nondiabetic European men and women. *Arch Intern Med* 2004 **164** 1066-1076.
151. Isomaa B, Almgren P, Tuomi T, Forsen B, Lahti K, Nissen M, Taskinen MR & Groop L. Cardiovascular morbidity and mortality associated with the metabolic syndrome. *Diabetes Care* 2001 **24** 683-689.
152. Lakka HM, Laaksonen DE, Lakka TA, Niskanen LK, Kumpusalo E, Tuomilehto J & Salonen JT. The metabolic syndrome and total and cardiovascular disease mortality in middle-aged men. *Jama* 2002 **288** 2709-2716.
153. Alberti KG, Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ, Cleeman JI, Donato KA, Fruchart JC, James WP, Loria CM & Smith SC, Jr. Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation* 2009 **120** 1640-1645.
154. Block GA, Klassen PS, Lazarus JM, Ofsthun N, Lowrie EG & Chertow GM. Mineral metabolism, mortality, and morbidity in maintenance hemodialysis. *J Am Soc Nephrol* 2004 **15** 2208-2218.
155. London GM, Marchais SJ, Guerin AP, Metivier F & Adda H. Arterial structure and function in end-stage renal disease. *Nephrol Dial Transplant* 2002 **17** 1713-1724.
156. Lehto S, Niskanen L, Suhonen M, Ronnema T & Laakso M. Medial artery calcification. A neglected harbinger of cardiovascular complications in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996 **16** 978-983.
157. London GM, Guerin AP, Marchais SJ, Metivier F, Pannier B & Adda H. Arterial media calcification in end-stage renal disease: impact on all-cause and cardiovascular mortality. *Nephrol Dial Transplant* 2003 **18** 1731-1740.
158. Marchais SJ, Metivier F, Guerin AP & London GM. Association of hyperphosphataemia with haemodynamic disturbances in end-stage renal disease. *Nephrol Dial Transplant* 1999 **14** 2178-2183.
159. Olson JC, Edmundowicz D, Becker DJ, Kuller LH & Orchard TJ. Coronary calcium in adults with type 1 diabetes: a stronger correlate of clinical coronary artery disease in men than in women. *Diabetes* 2000 **49** 1571-1578.

160. Jono S, McKee MD, Murry CE, Shioi A, Nishizawa Y, Mori K, Morii H & Giachelli CM. Phosphate regulation of vascular smooth muscle cell calcification. *Circ Res* 2000 **87** E10-17.
161. Juppner H. Phosphate and FGF-23. *Kidney Int Suppl* 2011 S24-27.
162. Murshed M, Schinke T, McKee MD & Karsenty G. Extracellular matrix mineralization is regulated locally; different roles of two gla-containing proteins. *J Cell Biol* 2004 **165** 625-630.
163. Beazley KE, Deasey S, Lima F & Nurminskaya MV. Transglutaminase 2-Mediated Activation of beta-Catenin Signaling Has a Critical Role in Warfarin-Induced Vascular Calcification. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012 **32** 123-130.
164. Lomashvili KA, Wang X, Wallin R & O'Neill WC. Matrix Gla protein metabolism in vascular smooth muscle and role in uremic vascular calcification. *J Biol Chem* 2011 **286** 28715-28722.
165. Price PA, Faus SA & Williamson MK. Warfarin-induced artery calcification is accelerated by growth and vitamin D. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000 **20** 317-327.
166. Schurgers LJ, Spronk HM, Skepper JN, Hackeng TM, Shanahan CM, Vermeer C, Weissberg PL & Proudfoot D. Post-translational modifications regulate matrix Gla protein function: importance for inhibition of vascular smooth muscle cell calcification. *J Thromb Haemost* 2007 **5** 2503-2511.
167. Giachelli CM. Vascular calcification mechanisms. *J Am Soc Nephrol* 2004 **15** 2959-2964.
168. Malik S, Wong ND, Franklin SS, Kamath TV, L'Italien GJ, Pio JR & Williams GR. Impact of the metabolic syndrome on mortality from coronary heart disease, cardiovascular disease, and all causes in United States adults. *Circulation* 2004 **110** 1245-1250.
169. Parker BD, Bauer DC, Ensrud KE & Ix JH. Association of osteocalcin and abdominal aortic calcification in older women: the study of osteoporotic fractures. *Calcif Tissue Int* 2010 **86** 185-191.
170. Kauppila LI, Polak JF, Cupples LA, Hannan MT, Kiel DP & Wilson PW. New indices to classify location, severity and progression of calcific lesions in the abdominal aorta: a 25-year follow-up study. *Atherosclerosis* 1997 **132** 245-250.
171. IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN). The nomenclature of steroids. Recommendations 1989. *Eur J Biochem* 1989 **186** 429-458.
172. Jameson LJ & De Groot LJ, Eds. *Endocrinology: adult and pediatric*. Philadelphia: Saunders - Elsevier, 2010.
173. Alberts B BD, Lewis J, Watson JD. *Biologie Moléculaire de la Cellule- 3ème édition*. 1995.
174. Gruber CJ, Tschugguel W, Schneeberger C & Huber JC. Production and actions of estrogens. *N Engl J Med* 2002 **346** 340-352.
175. Means GD, Mahendroo MS, Corbin CJ, Mathis JM, Powell FE, Mendelson CR & Simpson ER. Structural analysis of the gene encoding human aromatase cytochrome P-450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. *J Biol Chem* 1989 **264** 19385-19391.
176. Sebastian S & Bulun SE. A highly complex organization of the regulatory region of the human CYP19 (aromatase) gene revealed by the Human Genome Project. *J Clin Endocrinol Metab* 2001 **86** 4600-4602.

177. Liehr JG. Is estradiol a genotoxic mutagenic carcinogen? *Endocr Rev* 2000 **21** 40-54.
178. Hammond GL. Molecular properties of corticosteroid binding globulin and the sex-steroid binding proteins. *Endocr Rev* 1990 **11** 65-79.
179. Moll GW, Jr. & Rosenfield RL. Testosterone binding and free plasma androgen concentrations under physiological conditions: characterization by flow dialysis technique. *J Clin Endocrinol Metab* 1979 **49** 730-736.
180. Enmark E, Peltö-Huikko M, Grandien K, Lagercrantz S, Lagercrantz J, Fried G, Nordenskjöld M & Gustafsson JA. Human estrogen receptor beta-gene structure, chromosomal localization, and expression pattern. *J Clin Endocrinol Metab* 1997 **82** 4258-4265.
181. Shao D & Lazar MA. Modulating nuclear receptor function: may the phos be with you. *J Clin Invest* 1999 **103** 1617-1618.
182. Weigel NL. Steroid hormone receptors and their regulation by phosphorylation. *Biochem J* 1996 **319** ( Pt 3) 657-667.
183. Newton CJ, Buric R, Trapp T, Brockmeier S, Pagotto U & Stalla GK. The unliganded estrogen receptor (ER) transduces growth factor signals. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1994 **48** 481-486.
184. Smith CL, Conneely OM & O'Malley BW. Modulation of the ligand-independent activation of the human estrogen receptor by hormone and antihormone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993 **90** 6120-6124.
185. Kim HP, Lee JY, Jeong JK, Bae SW, Lee HK & Jo I. Nongenomic stimulation of nitric oxide release by estrogen is mediated by estrogen receptor alpha localized in caveolae. *Biochem Biophys Res Commun* 1999 **263** 257-262.
186. Watson CS, Norfleet AM, Pappas TC & Gametchu B. Rapid actions of estrogens in GH3/B6 pituitary tumor cells via a plasma membrane version of estrogen receptor-alpha. *Steroids* 1999 **64** 5-13.
187. Collins P & Webb C. Estrogen hits the surface. *Nat Med* 1999 **5** 1130-1131.
188. Osborne CK, Zhao H & Fuqua SA. Selective estrogen receptor modulators: structure, function, and clinical use. *J Clin Oncol* 2000 **18** 3172-3186.
189. Mauriac L. Standards, Options, Recommendations (SOR) pour la prise en charge des patientes atteintes de cancer du sein non métastatique (version abrégée). 2001 **12**.
190. Cochrane M-a. Tamoxifen for early breast cancer. *Cochrane Database Syst Rev* 2001 CD000486.
191. EBCTCG. Tamoxifen for early breast cancer: an overview of the randomised trials. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. *Lancet* 1998 **351** 1451-1467.
192. Come SE, Buzdar AU, Ingle JN, Arteaga CL, Brodie AM, Colditz GA, Johnston SR, Kristensen VN, Lonning PE, McDonnell DP, Osborne CK, Russo J, Santen RJ, Yee D & Hart CS. Proceedings of the Fourth International Conference on Recent Advances and Future Directions in Endocrine Manipulation of Breast Cancer: conference summary statement. *Clin Cancer Res* 2005 **11** 861s-864s.
193. Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML, Jackson RD, Beresford SA, Howard BV, Johnson KC, Kotchen JM & Ockene J. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *Jama* 2002 **288** 321-333.

194. Cummings SR, Eckert S, Krueger KA, Grady D, Powles TJ, Cauley JA, Norton L, Nickelsen T, Bjarnason NH, Morrow M, Lippman ME, Black D, Glusman JE, Costa A & Jordan VC. The effect of raloxifene on risk of breast cancer in postmenopausal women: results from the MORE randomized trial. Multiple Outcomes of Raloxifene Evaluation. *Jama* 1999 **281** 2189-2197.
195. Delmas PD, Bjarnason NH, Mitlak BH, Ravoux AC, Shah AS, Huster WJ, Draper M & Christiansen C. Effects of raloxifene on bone mineral density, serum cholesterol concentrations, and uterine endometrium in postmenopausal women. *N Engl J Med* 1997 **337** 1641-1647.
196. Ettinger B, Black DM, Mitlak BH, Knickerbocker RK, Nickelsen T, Genant HK, Christiansen C, Delmas PD, Zanchetta JR, Stakkestad J, Gluer CC, Krueger K, Cohen FJ, Eckert S, Ensrud KE, Avioli LV, Lips P & Cummings SR. Reduction of vertebral fracture risk in postmenopausal women with osteoporosis treated with raloxifene: results from a 3-year randomized clinical trial. Multiple Outcomes of Raloxifene Evaluation (MORE) Investigators. *Jama* 1999 **282** 637-645.
197. Johnston CC, Jr., Bjarnason NH, Cohen FJ, Shah A, Lindsay R, Mitlak BH, Huster W, Draper MW, Harper KD, Heath H, 3rd, Gennari C, Christiansen C, Arnaud CD & Delmas PD. Long-term effects of raloxifene on bone mineral density, bone turnover, and serum lipid levels in early postmenopausal women: three-year data from 2 double-blind, randomized, placebo-controlled trials. *Arch Intern Med* 2000 **160** 3444-3450.
198. Lufkin EG, Whitaker MD, Nickelsen T, Argueta R, Caplan RH, Knickerbocker RK & Riggs BL. Treatment of established postmenopausal osteoporosis with raloxifene: a randomized trial. *J Bone Miner Res* 1998 **13** 1747-1754.
199. Fisher B, Costantino JP, Wickerham DL, Redmond CK, Kavanah M, Cronin WM, Vogel V, Robidoux A, Dimitrov N, Atkins J, Daly M, Wieand S, Tan-Chiu E, Ford L & Wolmark N. Tamoxifen for prevention of breast cancer: report of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project P-1 Study. *J Natl Cancer Inst* 1998 **90** 1371-1388.
200. Riggs BL & Hartmann LC. Selective estrogen-receptor modulators -- mechanisms of action and application to clinical practice. *N Engl J Med* 2003 **348** 618-629.
201. Brodie A, Lu Q & Nakamura J. Aromatase in the normal breast and breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1997 **61** 281-286.
202. Chen S, Zhou D, Yang C, Okubo T, Kinoshita Y, Yu B, Kao YC & Itoh T. Modulation of aromatase expression in human breast tissue. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2001 **79** 35-40.
203. Thijssen JH & Blankenstein MA. Endogenous oestrogens and androgens in normal and malignant endometrial and mammary tissues. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1989 **25** 1953-1959.
204. Yue W, Santen RJ, Wang JP, Hamilton CJ & Demers LM. Aromatase within the breast. *Endocr Relat Cancer* 1999 **6** 157-164.
205. Geisler J, Haynes B, Anker G, Dowsett M & Lonning PE. Influence of letrozole and anastrozole on total body aromatization and plasma estrogen levels in postmenopausal breast cancer patients evaluated in a randomized, cross-over study. *J Clin Oncol* 2002 **20** 751-757.
206. Geisler J & Lonning PE. Endocrine effects of aromatase inhibitors and inactivators in vivo: review of data and method limitations. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2005 **95** 75-81.

207. Coombes RC, Hall E, Gibson LJ, Paridaens R, Jassem J, Delozier T, Jones SE, Alvarez I, Bertelli G, Ortmann O, Coates AS, Bajetta E, Dodwell D, Coleman RE, Fallowfield LJ, Mickiewicz E, Andersen J, Lonning PE, Cocconi G, Stewart A, Stuart N, Snowdon CF, Carpentieri M, Massimini G & Bliss JM. A randomized trial of exemestane after two to three years of tamoxifen therapy in postmenopausal women with primary breast cancer. *N Engl J Med* 2004 **350** 1081-1092.
208. Jakesz R, Jonat W, Gnant M, Mittlboeck M, Greil R, Tausch C, Hilfrich J, Kwasny W, Menzel C, Samonigg H, Seifert M, Gademann G, Kaufmann M & Wolfgang J. Switching of postmenopausal women with endocrine-responsive early breast cancer to anastrozole after 2 years' adjuvant tamoxifen: combined results of ABCSG trial 8 and ARNO 95 trial. *Lancet* 2005 **366** 455-462.
209. Boccardo F, Rubagotti A, Puntoni M, Guglielmini P, Amoroso D, Fini A, Paladini G, Mesiti M, Romeo D, Rinaldini M, Scali S, Porpiglia M, Benedetto C, Restuccia N, Buzzi F, Franchi R, Massidda B, Distante V, Amadori D & Sismondi P. Switching to anastrozole versus continued tamoxifen treatment of early breast cancer: preliminary results of the Italian Tamoxifen Anastrozole Trial. *J Clin Oncol* 2005 **23** 5138-5147.
210. Baum M, Budzar AU, Cuzick J, Forbes J, Houghton JH, Klijn JG & Sahmoud T. Anastrozole alone or in combination with tamoxifen versus tamoxifen alone for adjuvant treatment of postmenopausal women with early breast cancer: first results of the ATAC randomised trial. *Lancet* 2002 **359** 2131-2139.
211. Baum M, Buzdar A, Cuzick J, Forbes J, Houghton J, Howell A & Sahmoud T. Anastrozole alone or in combination with tamoxifen versus tamoxifen alone for adjuvant treatment of postmenopausal women with early-stage breast cancer: results of the ATAC (Arimidex, Tamoxifen Alone or in Combination) trial efficacy and safety update analyses. *Cancer* 2003 **98** 1802-1810.
212. Howell A, Cuzick J, Baum M, Buzdar A, Dowsett M, Forbes JF, Hochtin-Boes G, Houghton J, Locker GY & Tobias JS. Results of the ATAC (Arimidex, Tamoxifen, Alone or in Combination) trial after completion of 5 years' adjuvant treatment for breast cancer. *Lancet* 2005 **365** 60-62.
213. Goss PE, Ingle JN, Martino S, Robert NJ, Muss HB, Piccart MJ, Castiglione M, Tu D, Shepherd LE, Pritchard KI, Livingston RB, Davidson NE, Norton L, Perez EA, Abrams JS, Therasse P, Palmer MJ & Pater JL. A randomized trial of letrozole in postmenopausal women after five years of tamoxifen therapy for early-stage breast cancer. *N Engl J Med* 2003 **349** 1793-1802.
214. ASCO. American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guidelines. Breast Cancer: Update on Adjuvant Endocrine Therapy for Women with Hormone Receptor-Positive Breast Cancer. 2010 [cited 2010 Dec 15].
215. Kreienberg R KI, Albert U, et al., Ed. *Interdisciplinary S3. Guidelines for the Diagnosis, Treatment and Follow-up Care of Breast Cancer*. Munchen: Zuckschwerdt, 2008.
216. NICE. National Collaborating Centre for Cancer, National Institute of Clinical Excellence. Early and locally advanced breast cancer: diagnosis and treatment. 2009 [cited 2010 Dec 15]. .
217. Wolters R, Regierer AC, Schwentner L, Geyer V, Possinger K, Kreienberg R, Wischnewsky MB & Wockel A. A comparison of international breast cancer guidelines - Do the national guidelines differ in treatment recommendations? *Eur J Cancer* 2012 **48** 1-11.

218. Smith IE & Dowsett M. Aromatase inhibitors in breast cancer. *N Engl J Med* 2003 **348** 2431-2442.
219. Remontet L, Esteve J, Bouvier AM, Grosclaude P, Launoy G, Menegoz F, Exbrayat C, Tretare B, Carli PM, Guizard AV, Troussard X, Bercelli P, Colonna M, Halna JM, Hedelin G, Mace-Lesec'h J, Peng J, Buemi A, Velten M, Jouglu E, Arveux P, Le Bodic L, Michel E, Sauvage M, Schvartz C & Faivre J. Cancer incidence and mortality in France over the period 1978-2000. *Rev Epidemiol Sante Publique* 2003 **51** 3-30.
220. Slemenda C, Hui SL, Longcope C & Johnston CC. Sex steroids and bone mass. A study of changes about the time of menopause. *J Clin Invest* 1987 **80** 1261-1269.
221. Stone K, Bauer DC, Black DM, Sklarin P, Ensrud KE & Cummings SR. Hormonal predictors of bone loss in elderly women: a prospective study. The Study of Osteoporotic Fractures Research Group. *J Bone Miner Res* 1998 **13** 1167-1174.
222. Cummings SR, Browner WS, Bauer D, Stone K, Ensrud K, Jamal S & Ettinger B. Endogenous hormones and the risk of hip and vertebral fractures among older women. Study of Osteoporotic Fractures Research Group. *N Engl J Med* 1998 **339** 733-738.
223. Garnero P, Sornay-Rendu E, Claustrat B & Delmas PD. Biochemical markers of bone turnover, endogenous hormones and the risk of fractures in postmenopausal women: the OFELY study. *J Bone Miner Res* 2000 **15** 1526-1536.
224. Goderie-Plomp HW, van der Klift M, de Ronde W, Hofman A, de Jong FH & Pols HA. Endogenous sex hormones, sex hormone-binding globulin, and the risk of incident vertebral fractures in elderly men and women: the Rotterdam Study. *J Clin Endocrinol Metab* 2004 **89** 3261-3269.
225. Chapurlat RD, Garnero P, Breart G, Meunier PJ & Delmas PD. Serum estradiol and sex hormone-binding globulin and the risk of hip fracture in elderly women: the EPIDOS study. *J Bone Miner Res* 2000 **15** 1835-1841.
226. Lee JS, LaCroix AZ, Wu L, Cauley JA, Jackson RD, Kooperberg C, Leboff MS, Robbins J, Lewis CE, Bauer DC & Cummings SR. Associations of serum sex hormone-binding globulin and sex hormone concentrations with hip fracture risk in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 2008 **93** 1796-1803.
227. Garnero P, Hausherr E, Chapuy MC, Marcelli C, Grandjean H, Muller C, Cormier C, Breart G, Meunier PJ & Delmas PD. Markers of bone resorption predict hip fracture in elderly women: the EPIDOS Prospective Study. *J Bone Miner Res* 1996 **11** 1531-1538.
228. Chapurlat RD, Bauer DC & Cummings SR. Association between endogenous hormones and sex hormone-binding globulin and bone turnover in older women: study of osteoporotic fractures. *Bone* 2001 **29** 381-387.
229. Hoppe E, Bouvard B, Royer M, Audran M & Legrand E. Sex hormone-binding globulin in osteoporosis. *Joint Bone Spine* 2010 **77** 306-312.
230. Lormeau C, Soudan B, d'Herbomez M, Pigny P, Duquesnoy B & Cortet B. Sex hormone-binding globulin, estradiol, and bone turnover markers in male osteoporosis. *Bone* 2004 **34** 933-939.
231. Melton LJ, 3rd, Khosla S, Malkasian GD, Achenbach SJ, Oberg AL & Riggs BL. Fracture risk after bilateral oophorectomy in elderly women. *J Bone Miner Res* 2003 **18** 900-905.

232. Bilezikian JP, Morishima A, Bell J & Grumbach MM. Increased bone mass as a result of estrogen therapy in a man with aromatase deficiency. *N Engl J Med* 1998 **339** 599-603.
233. Carani C, Qin K, Simoni M, Faustini-Fustini M, Serpente S, Boyd J, Korach KS & Simpson ER. Effect of testosterone and estradiol in a man with aromatase deficiency. *N Engl J Med* 1997 **337** 91-95.
234. Khosla S, Melton LJ, 3rd & Riggs BL. Clinical review 144: Estrogen and the male skeleton. *J Clin Endocrinol Metab* 2002 **87** 1443-1450.
235. Miyaura C, Toda K, Inada M, Ohshiba T, Matsumoto C, Okada T, Ito M, Shizuta Y & Ito A. Sex- and age-related response to aromatase deficiency in bone. *Biochem Biophys Res Commun* 2001 **280** 1062-1068.
236. Morishima A, Grumbach MM, Simpson ER, Fisher C & Qin K. Aromatase deficiency in male and female siblings caused by a novel mutation and the physiological role of estrogens. *J Clin Endocrinol Metab* 1995 **80** 3689-3698.
237. Oz OK, Zerwekh JE, Fisher C, Graves K, Nanu L, Millsaps R & Simpson ER. Bone has a sexually dimorphic response to aromatase deficiency. *J Bone Miner Res* 2000 **15** 507-514.
238. Riggs BL, Khosla S & Melton LJ, 3rd. Sex steroids and the construction and conservation of the adult skeleton. *Endocr Rev* 2002 **23** 279-302.
239. Vanderschueren D, Boonen S, Ederveen AG, de Coster R, Van Herck E, Moermans K, Vandenput L, Verstuyf A & Bouillon R. Skeletal effects of estrogen deficiency as induced by an aromatase inhibitor in an aged male rat model. *Bone* 2000 **27** 611-617.
240. Vanderschueren D, Van Herck E, De Coster R & Bouillon R. Aromatization of androgens is important for skeletal maintenance of aged male rats. *Calcif Tissue Int* 1996 **59** 179-183.
241. Vanderschueren D, van Herck E, Nijs J, Ederveen AG, De Coster R & Bouillon R. Aromatase inhibition impairs skeletal modeling and decreases bone mineral density in growing male rats. *Endocrinology* 1997 **138** 2301-2307.
242. Khosla S, Melton LJ, 3rd, Atkinson EJ & O'Fallon WM. Relationship of serum sex steroid levels to longitudinal changes in bone density in young versus elderly men. *J Clin Endocrinol Metab* 2001 **86** 3555-3561.
243. Szulc P, Munoz F, Claustrat B, Garnero P, Marchand F, Duboeuf F & Delmas PD. Bioavailable estradiol may be an important determinant of osteoporosis in men: the MINOS study. *J Clin Endocrinol Metab* 2001 **86** 192-199.
244. Khosla S, Melton LJ, 3rd, Atkinson EJ, O'Fallon WM, Klee GG & Riggs BL. Relationship of serum sex steroid levels and bone turnover markers with bone mineral density in men and women: a key role for bioavailable estrogen. *J Clin Endocrinol Metab* 1998 **83** 2266-2274.
245. Callewaert F, Venken K, Ophoff J, De Gendt K, Torcasio A, van Lenthe GH, Van Oosterwyck H, Boonen S, Bouillon R, Verhoeven G & Vanderschueren D. Differential regulation of bone and body composition in male mice with combined inactivation of androgen and estrogen receptor-alpha. *FASEB J* 2009 **23** 232-240.
246. Venken K, De Gendt K, Boonen S, Ophoff J, Bouillon R, Swinnen JV, Verhoeven G & Vanderschueren D. Relative impact of androgen and estrogen receptor activation in the effects of androgens on trabecular and cortical bone in growing male mice: a study in the androgen receptor knockout mouse model. *J Bone Miner Res* 2006 **21** 576-585.

247. Vico L & Vanacker JM. Sex hormones and their receptors in bone homeostasis: insights from genetically modified mouse models. *Osteoporos Int* 2010 **21** 365-372.
248. Wakley GK, Schutte HD, Jr., Hannon KS & Turner RT. Androgen treatment prevents loss of cancellous bone in the orchidectomized rat. *J Bone Miner Res* 1991 **6** 325-330.
249. Moverare S, Venken K, Eriksson AL, Andersson N, Skrtic S, Wergedal J, Mohan S, Salmon P, Bouillon R, Gustafsson JA, Vanderschueren D & Ohlsson C. Differential effects on bone of estrogen receptor alpha and androgen receptor activation in orchidectomized adult male mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003 **100** 13573-13578.
250. Ettinger B, Pressman A, Sklarin P, Bauer DC, Cauley JA & Cummings SR. Associations between low levels of serum estradiol, bone density, and fractures among elderly women: the study of osteoporotic fractures. *J Clin Endocrinol Metab* 1998 **83** 2239-2243.
251. Heshmati HM, Khosla S, Robins SP, O'Fallon WM, Melton LJ, 3rd & Riggs BL. Role of low levels of endogenous estrogen in regulation of bone resorption in late postmenopausal women. *J Bone Miner Res* 2002 **17** 172-178.
252. Arlot ME, Sornay-Rendu E, Garnero P, Vey-Marty B & Delmas PD. Apparent pre- and postmenopausal bone loss evaluated by DXA at different skeletal sites in women: the OFELY cohort. *J Bone Miner Res* 1997 **12** 683-690.
253. Confavreux CB, Fontana A, Guastalla JP, Munoz F, Brun J & Delmas PD. Estrogen-dependent increase in bone turnover and bone loss in postmenopausal women with breast cancer treated with anastrozole. Prevention with bisphosphonates. *Bone* 2007 **41** 346-352.
254. Eastell R, Hannon RA, Cuzick J, Dowsett M, Clack G & Adams JE. Effect of an aromatase inhibitor on bmd and bone turnover markers: 2-year results of the Anastrozole, Tamoxifen, Alone or in Combination (ATAC) trial (18233230). *J Bone Miner Res* 2006 **21** 1215-1223.
255. Eastell R, Adams JE, Coleman RE, Howell A, Hannon RA, Cuzick J, Mackey JR, Beckmann MW & Clack G. Effect of anastrozole on bone mineral density: 5-year results from the anastrozole, tamoxifen, alone or in combination trial 18233230. *J Clin Oncol* 2008 **26** 1051-1057.
256. Buzdar A, Howell A, Cuzick J, Wale C, Distler W, Hocht-Boes G, Houghton J, Locker GY & Nabholz JM. Comprehensive side-effect profile of anastrozole and tamoxifen as adjuvant treatment for early-stage breast cancer: long-term safety analysis of the ATAC trial. *Lancet Oncol* 2006 **7** 633-643.
257. Perez EA, Josse RG, Pritchard KI, Ingle JN, Martino S, Findlay BP, Shenkier TN, Tozer RG, Palmer MJ, Shepherd LE, Liu S, Tu D & Goss PE. Effect of letrozole versus placebo on bone mineral density in women with primary breast cancer completing 5 or more years of adjuvant tamoxifen: a companion study to NCIC CTG MA.17. *J Clin Oncol* 2006 **24** 3629-3635.
258. Lonning PE, Geisler J, Krag LE, Erikstein B, Bremnes Y, Hagen AI, Schlichting E, Lien EA, Ofjord ES, Paolini J, Polli A & Massimini G. Effects of exemestane administered for 2 years versus placebo on bone mineral density, bone biomarkers, and plasma lipids in patients with surgically resected early breast cancer. *J Clin Oncol* 2005 **23** 5126-5137.
259. Hadji P, Ziller M, Kieback DG, Menschik T, Kalder M, Kuck J & Hasenburger A. The effect of exemestane or tamoxifen on markers of bone turnover: results of

- a German sub-study of the Tamoxifen Exemestane Adjuvant Multicentre (TEAM) trial. *Breast* 2009 **18** 159-164.
260. Aihara T, Suemasu K, Takei H, Hozumi Y, Takehara M, Saito T, Ohsumi S, Masuda N & Ohashi Y. Effects of exemestane, anastrozole and tamoxifen on bone mineral density and bone turnover markers in postmenopausal early breast cancer patients: results of N-SAS BC 04, the TEAM Japan substudy. *Oncology* 2010 **79** 376-381.
261. McCloskey EV, Hannon RA, Lakner G, Fraser WD, Clack G, Miyamoto A, Finkelman RD & Eastell R. Effects of third generation aromatase inhibitors on bone health and other safety parameters: results of an open, randomised, multi-centre study of letrozole, exemestane and anastrozole in healthy postmenopausal women. *Eur J Cancer* 2007 **43** 2523-2531.
262. Hadji P, Aapro MS, Body JJ, Bundred NJ, Brufsky A, Coleman RE, Gnant M, Guise T & Lipton A. Management of aromatase inhibitor-associated bone loss in postmenopausal women with breast cancer: practical guidance for prevention and treatment. *Ann Oncol* 2011 **22** 2546-2555.
263. Reid DM, Doughty J, Eastell R, Heys SD, Howell A, McCloskey EV, Powles T, Selby P & Coleman RE. Guidance for the management of breast cancer treatment-induced bone loss: a consensus position statement from a UK Expert Group. *Cancer Treat Rev* 2008 **34 Suppl 1** S3-18.
264. Markopoulos C, Tzoracoleftherakis E, Polychronis A, Venizelos B, Dafni U, Xepapadakis G, Papadiamantis J, Zobolas V, Misitzis J, Kalogerakos K, Sarantopoulou A, Siasos N, Koukouras D, Antonopoulou Z, Lazarou S & Gogas H. Management of anastrozole-induced bone loss in breast cancer patients with oral risedronate: results from the ARBI prospective clinical trial. *Breast Cancer Res* 2010 **12** R24.
265. Van Poznak C, Hannon RA, Mackey JR, Campone M, Apffelstaedt JP, Clack G, Barlow D, Makris A & Eastell R. Prevention of aromatase inhibitor-induced bone loss using risedronate: the SABRE trial. *J Clin Oncol* 2010 **28** 967-975.
266. Hines SL, Sloan JA, Atherton PJ, Perez EA, Dakhil SR, Johnson DB, Reddy PS, Dalton RJ, Mattar BI & Loprinzi CL. Zoledronic acid for treatment of osteopenia and osteoporosis in women with primary breast cancer undergoing adjuvant aromatase inhibitor therapy. *Breast* 2010 **19** 92-96.
267. Safra T, Bernstein-Molho R, Greenberg J, Pelles-Avraham S, Stephansky I, Sarid D, Inbar MJ, Stemmer SM & Geffen DB. The Protective Effect of Zoledronic Acid on Bone Loss in Postmenopausal Women with Early Breast Cancer Treated with Sequential Tamoxifen and Letrozole: A Prospective, Randomized, Phase II Trial. *Oncology* 2011 **81** 298-305.
268. Brufsky AM, Bosserman LD, Caradonna RR, Haley BB, Jones CM, Moore HC, Jin L, Warsi GM, Ericson SG & Perez EA. Zoledronic acid effectively prevents aromatase inhibitor-associated bone loss in postmenopausal women with early breast cancer receiving adjuvant letrozole: Z-FAST study 36-month follow-up results. *Clin Breast Cancer* 2009 **9** 77-85.
269. Brufsky AM, Harker WG, Beck JT, Bosserman L, Vogel C, Seidler C, Jin L, Warsi G, Argonza-Aviles E, Hohneker J, Ericson SG & Perez EA. Final 5-year results of Z-FAST trial: Adjuvant Zoledronic Acid Maintains Bone Mass in Postmenopausal Breast Cancer Patients Receiving Letrozole. *Cancer* 2011.
270. Llombart A, Frassoldati A, Pajja O, Sleeboom HP, Jerusalem G, Mebis J, Deleu I, Miller J, Schenk N & Neven P. Immediate Administration of Zoledronic Acid Reduces Aromatase Inhibitor-Associated Bone Loss in Postmenopausal

- Women With Early Breast Cancer: 12-Month Analysis of the E-ZO-FAST Trial. *Clin Breast Cancer* 2011.
271. Ellis GK, Bone HG, Chlebowski R, Paul D, Spadafora S, Smith J, Fan M & Jun S. Randomized trial of denosumab in patients receiving adjuvant aromatase inhibitors for nonmetastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 2008 **26** 4875-4882.
  272. Ellis GK, Bone HG, Chlebowski R, Paul D, Spadafora S, Fan M & Kim D. Effect of denosumab on bone mineral density in women receiving adjuvant aromatase inhibitors for non-metastatic breast cancer: subgroup analyses of a phase 3 study. *Breast Cancer Res Treat* 2009 **118** 81-87.
  273. Hadji P, Body JJ, Aapro MS, Brufsky A, Coleman RE, Guise T, Lipton A & Tubiana-Hulin M. Practical guidance for the management of aromatase inhibitor-associated bone loss. *Ann Oncol* 2008 **19** 1407-1416.
  274. Lipton A, Cook R, Saad F, Major P, Garnero P, Terpos E, Brown JE & Coleman RE. Normalization of bone markers is associated with improved survival in patients with bone metastases from solid tumors and elevated bone resorption receiving zoledronic acid. *Cancer* 2008 **113** 193-201.
  275. Gnant M, Mlineritsch B, Schippinger W, Luschin-Ebengreuth G, Postlberger S, Menzel C, Jakesz R, Seifert M, Hubalek M, Bjelic-Radisic V, Samonigg H, Tausch C, Eidtmann H, Steger G, Kwasny W, Dubsky P, Fridrik M, Fitzal F, Stierer M, Rucklinger E, Greil R & Marth C. Endocrine therapy plus zoledronic acid in premenopausal breast cancer. *N Engl J Med* 2009 **360** 679-691.
  276. Gnant M, Mlineritsch B, Stoeger H, Luschin-Ebengreuth G, Heck D, Menzel C, Jakesz R, Seifert M, Hubalek M, Pristauz G, Bauernhofer T, Eidtmann H, Eiermann W, Steger G, Kwasny W, Dubsky P, Hochreiner G, Forsthuber EP, Fesl C & Greil R. Adjuvant endocrine therapy plus zoledronic acid in premenopausal women with early-stage breast cancer: 62-month follow-up from the ABCSG-12 randomised trial. *Lancet Oncol Epub*2011 **12** 631-641.
  277. Brinkworth MH, Weinbauer GF, Schlatt S & Nieschlag E. Identification of male germ cells undergoing apoptosis in adult rats. *J Reprod Fertil* 1995 **105** 25-33.
  278. Henriksen K, Hakovirta H & Parvinen M. Testosterone inhibits and induces apoptosis in rat seminiferous tubules in a stage-specific manner: in situ quantification in squash preparations after administration of ethane dimethane sulfonate. *Endocrinology* 1995 **136** 3285-3291.
  279. Pi M, Chen L, Huang MZ, Zhu W, Ringhofer B, Luo J, Christenson L, Li B, Zhang J, Jackson PD, Faber P, Brunden KR, Harrington JJ & Quarles LD. GPRC6A null mice exhibit osteopenia, feminization and metabolic syndrome. *PLoS One* 2008 **3** e3858.
  280. Zhang X, Odom DT, Koo SH, Conkright MD, Canettieri G, Best J, Chen H, Jenner R, Herbolsheimer E, Jacobsen E, Kadam S, Ecker JR, Emerson B, Hogenesch JB, Unterman T, Young RA & Montminy M. Genome-wide analysis of cAMP-response element binding protein occupancy, phosphorylation, and target gene activation in human tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005 **102** 4459-4464.
  281. Alberti KG, Zimmet P & Shaw J. The metabolic syndrome--a new worldwide definition. *Lancet* 2005 **366** 1059-1062.
  282. Kumar TR. Functional analysis of LHbeta knockout mice. *Mol Cell Endocrinol* 2007 **269** 81-84.
  283. Ma X, Dong Y, Matzuk MM & Kumar TR. Targeted disruption of luteinizing hormone beta-subunit leads to hypogonadism, defects in gonadal

- steroidogenesis, and infertility. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004 **101** 17294-17299.
284. Kirmani S, Atkinson EJ, Melton LJ, 3rd, Riggs BL, Amin S & Khosla S. Relationship of testosterone and osteocalcin levels during growth. *J Bone Miner Res* 2011 **26** 2212-2216.
285. Levinger I, Zebaze R, Jerums G, Hare DL, Selig S & Seeman E. The effect of acute exercise on undercarboxylated osteocalcin in obese men. *Osteoporos Int* 2011 **22** 1621-1626.
286. Rochefort GY, Rocher E, Aveline PC, Garnero P, Bab I, Chappard C, Jaffre C & Benhamou CL. Osteocalcin-insulin relationship in obese children: a role for the skeleton in energy metabolism. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2011 **75** 265-270.
287. Rector RS, Loethen J, Ruebel M, Thomas TR & Hinton PS. Serum markers of bone turnover are increased by modest weight loss with or without weight-bearing exercise in overweight premenopausal women. *Appl Physiol Nutr Metab* 2009 **34** 933-941.
288. Adami S, Gatti D, Viapiana O, Fiore CE, Nuti R, Luisetto G, Ponte M & Rossini M. Physical activity and bone turnover markers: a cross-sectional and a longitudinal study. *Calcif Tissue Int* 2008 **83** 388-392.
289. Lester ME, Urso ML, Evans RK, Pierce JR, Spiering BA, Maresh CM, Hatfield DL, Kraemer WJ & Nindl BC. Influence of exercise mode and osteogenic index on bone biomarker responses during short-term physical training. *Bone* 2009 **45** 768-776.
290. Ricciotti R, Gemini R, Foschi F, Dubbini S, Fattoretti P & Bertoni-Freddari C. Physical activity and biochemical markers of bone turnover in elderly patients. *Arch Gerontol Geriatr* 1998 **26** 49-53.
291. Kerschan-Schindl K, Thalmann M, Sodeck GH, Skenderi K, Matalas AL, Grampp S, Ebner C & Pietschmann P. A 246-km continuous running race causes significant changes in bone metabolism. *Bone* 2009 **45** 1079-1083.
292. Wiczorek-Baranowska A, Nowak A & Pilaczynska-Szczesniak L. Osteocalcin and glucose metabolism in postmenopausal women subjected to aerobic training program for 8 weeks. *Metabolism* 2011.
293. Mendel CM. The free hormone hypothesis. Distinction from the free hormone transport hypothesis. *J Androl* 1992 **13** 107-116.
294. Fortunati N, Becchis M, Catalano MG, Comba A, Ferrera P, Raineri M, Berta L & Frairia R. Sex hormone-binding globulin, its membrane receptor, and breast cancer: a new approach to the modulation of estradiol action in neoplastic cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1999 **69** 473-479.
295. Hammes A, Andreassen TK, Spoelgen R, Raila J, Hubner N, Schulz H, Metzger J, Schweigert FJ, Lupp PB, Nykjaer A & Willnow TE. Role of endocytosis in cellular uptake of sex steroids. *Cell* 2005 **122** 751-762.
296. Porto CS, Lazari MF, Abreu LC, Bardin CW & Gunsalus GL. Receptors for androgen-binding proteins: internalization and intracellular signalling. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1995 **53** 561-565.
297. Rosner W, Hryb DJ, Khan MS, Nakhla AM & Romas NA. Sex hormone-binding globulin mediates steroid hormone signal transduction at the plasma membrane. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1999 **69** 481-485.
298. Bonnet F, Balkau B, Malecot JM, Picard P, Lange C, Fumeron F, Aubert R, Raverot V, Dechaud H, Tichet J, Lecomte P & Pugeat M. Sex hormone-binding globulin predicts the incidence of hyperglycemia in women: interactions with adiponectin levels. *Eur J Endocrinol* 2009 **161** 81-85.

299. Ding EL, Song Y, Malik VS & Liu S. Sex differences of endogenous sex hormones and risk of type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Jama* 2006 **295** 1288-1299.
300. Ding EL, Song Y, Manson JE, Hunter DJ, Lee CC, Rifai N, Buring JE, Gaziano JM & Liu S. Sex hormone-binding globulin and risk of type 2 diabetes in women and men. *N Engl J Med* 2009 **361** 1152-1163.
301. Kalyani RR, Franco M, Dobs AS, Ouyang P, Vaidya D, Bertoni A, Gapstur SM & Golden SH. The association of endogenous sex hormones, adiposity, and insulin resistance with incident diabetes in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 2009 **94** 4127-4135.
302. Lakshman KM, Bhasin S & Araujo AB. Sex hormone-binding globulin as an independent predictor of incident type 2 diabetes mellitus in men. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2010 **65** 503-509.
303. Page-Wilson G, Goulart AC & Rexrode KM. Interrelation between sex hormones and plasma sex hormone-binding globulin and hemoglobin A1c in healthy postmenopausal women. *Metab Syndr Relat Disord* 2009 **7** 249-254.
304. Vikan T, Schirmer H, Njolstad I & Svartberg J. Low testosterone and sex hormone-binding globulin levels and high estradiol levels are independent predictors of type 2 diabetes in men. *Eur J Endocrinol* 2010 **162** 747-754.
305. Le TN, Nestler JE, Strauss JF, 3rd & Wickham EP, 3rd. Sex hormone-binding globulin and type 2 diabetes mellitus. *Trends Endocrinol Metab* 2012 **23** 32-40.
306. Cousin P, Calemard-Michel L, Lejeune H, Raverot G, Yessaad N, Emptoz-Bonneton A, Morel Y & Pugeat M. Influence of SHBG gene pentanucleotide TAAAA repeat and D327N polymorphism on serum sex hormone-binding globulin concentration in hirsute women. *J Clin Endocrinol Metab* 2004 **89** 917-924.
307. Perry JR, Weedon MN, Langenberg C, Jackson AU, Lyssenko V, Sparso T, Thorleifsson G, Grallert H, Ferrucci L, Maggio M, Paolisso G, Walker M, Palmer CN, Payne F, Young E, Herder C, Narisu N, Morken MA, Bonnycastle LL, Owen KR, Shields B, Knight B, Bennett A, Groves CJ, Ruukonen A, Jarvelin MR, Pearson E, Pascoe L, Ferrannini E, Bornstein SR, Stringham HM, Scott LJ, Kuusisto J, Nilsson P, Neptin M, Gjesing AP, Pisinger C, Lauritzen T, Sandbaek A, Sampson M, Zeggini E, Lindgren CM, Steinthorsdottir V, Thorsteinsdottir U, Hansen T, Schwarz P, Illig T, Laakso M, Stefansson K, Morris AD, Groop L, Pedersen O, Boehnke M, Barroso I, Wareham NJ, Hattersley AT, McCarthy MI & Frayling TM. Genetic evidence that raised sex hormone binding globulin (SHBG) levels reduce the risk of type 2 diabetes. *Hum Mol Genet* 2010 **19** 535-544.
308. Agirbasli M, Agaoglu NB, Orak N, Caglioz H, Ocek T, Poci N, Salaj A & Maya S. Sex hormones and metabolic syndrome in children and adolescents. *Metabolism* 2009 **58** 1256-1262.
309. Bhasin S, Jasjua GK, Pencina M, D'Agostino R, Sr., Coviello AD, Vasani RS & Travison TG. Sex hormone-binding globulin, but not testosterone, is associated prospectively and independently with incident metabolic syndrome in men: the framingham heart study. *Diabetes Care* 2011 **34** 2464-2470.
310. Glueck CJ, Morrison JA, Daniels S, Wang P & Stroop D. Sex hormone-binding globulin, oligomenorrhea, polycystic ovary syndrome, and childhood insulin at age 14 years predict metabolic syndrome and class III obesity at age 24 years. *J Pediatr* 2011 **159** 308-313 e302.

311. Li C, Ford ES, Li B, Giles WH & Liu S. Association of testosterone and sex hormone-binding globulin with metabolic syndrome and insulin resistance in men. *Diabetes Care* 2010 **33** 1618-1624.
312. Hogeveen KN, Cousin P, Pugeat M, Dewailly D, Soudan B & Hammond GL. Human sex hormone-binding globulin variants associated with hyperandrogenism and ovarian dysfunction. *J Clin Invest* 2002 **109** 973-981.
313. Nestler JE, Powers LP, Matt DW, Steingold KA, Plymate SR, Rittmaster RS, Clore JN & Blackard WG. A direct effect of hyperinsulinemia on serum sex hormone-binding globulin levels in obese women with the polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 1991 **72** 83-89.
314. Pugeat M, Cousin P, Baret C, Lejeune H & Forest MG. Sex hormone-binding globulin during puberty in normal and hyperandrogenic girls. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2000 **13 Suppl 5** 1277-1279.
315. Wickham EP, 3rd, Ewens KG, Legro RS, Dunaif A, Nestler JE & Strauss JF, 3rd. Polymorphisms in the SHBG gene influence serum SHBG levels in women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2011 **96** E719-727.
316. Shin JY, Kim SK, Lee MY, Kim HS, Ye BI, Shin YG, Baik SK & Chung CH. Serum sex hormone-binding globulin levels are independently associated with nonalcoholic fatty liver disease in people with type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 2011 **94** 156-162.
317. Nanda S, Savvidou M, Syngelaki A, Akolekar R & Nicolaides KH. Prediction of gestational diabetes mellitus by maternal factors and biomarkers at 11 to 13 weeks. *Prenat Diagn* 2011 **31** 135-141.
318. Pepene CE, Ilie IR, Marian I & Duncea I. Circulating osteoprotegerin and soluble receptor activator of nuclear factor kappaB ligand in polycystic ovary syndrome: relationships to insulin resistance and endothelial dysfunction. *Eur J Endocrinol* 2011 **164** 61-68.

**Nom et Prénom de l'auteur :** CONFAVREUX Cyrille

**Titre de la thèse :** Physiologie intégrative du métabolisme énergétique, de l'os et de la fertilité : rôle de l'ostéocalcine et des hormones sexuelles.

### Résumé de la thèse :

L'arrivée des souris transgéniques a ouvert une ère nouvelle pour la physiologie intégrative avec la possibilité d'étudier la fonction d'un gène au sein d'un organisme vivant. De véritables révolutions dans nos connaissances physiologiques ont ainsi été rendues possibles. C'est tout particulièrement le cas au niveau osseux avec la découverte du rôle, jusqu'alors insoupçonné, de l'os sur le métabolisme énergétique et la fertilité.

Sur les recommandations du Pr Pierre Delmas, j'ai passé 2 ans dans le laboratoire de génétique osseuse du Pr Gérard Karsenty à Columbia University, New-York USA pour apprendre la physiologie intégrative. A mon retour, sous la direction du Pr Roland Chapurlat (Université de Lyon – INSERM U1033), j'ai pu continuer à travailler en lien étroit avec le Pr Karsenty et participer au transfert chez l'homme de cette nouvelle endocrinologie osseuse. Dans cette thèse je présenterai les avancées fondamentales les plus récentes auxquelles j'ai eu la chance de participer aux Etats-Unis et les premiers transferts à l'homme.

La première partie synthétise le contrôle neurologique de la masse osseuse. Elle présente comment la leptine agit dans le tronc cérébral en freinant les neurones sérotoninergiques qui projettent sur l'hypothalamus pour contrôler la masse osseuse (noyau du VMH) et l'appétit (noyau arqué). La sérotonine cérébrale abaisse le tonus sympathique et stimule la masse osseuse.<sup>1</sup>

La seconde partie présente la régulation osseuse du métabolisme énergétique avec la description d'une nouvelle hormone protéique, l'ostéocalcine, qui est sécrétée par l'ostéoblaste. Celle-ci stimule la production d'insuline par le pancréas, la prolifération des cellules  $\beta$  pancréatiques et diminue l'insulinorésistance périphérique<sup>2</sup>. Avec l'étude OSMID, menée en collaboration avec le Service d'Orthopédie du Pr Carret (Hospices Civils de Lyon) et du Dr Lee (Columbia University), nous apportons la première démonstration directe chez l'homme de l'action de l'ostéocalcine sur la glycémie, suggérant que l'ostéome ostéoïde est un adénome bénin sécrétant de l'ostéocalcine<sup>3</sup>. Par ailleurs, avec le Dr Szulc (Inserm U1033), dans une analyse transversale de la cohorte d'hommes âgés MINOS, nous montrons que l'ostéocalcine est négativement corrélée, en régression logistique, à la glycémie, au syndrome métabolique et à l'existence de calcifications aortiques abdominales indépendamment des autres marqueurs osseux. Ces résultats suggèrent que l'ostéocalcine pourrait être un nouveau facteur de risque cardiovasculaire<sup>4</sup>.

La troisième partie concerne les relations entre l'os et les hormones sexuelles. D'abord, fruit d'une collaboration avec le Dr Fontana (Inserm U1033) et le Dr Guastalla (Centre Léon Bérard, Lyon), nous présentons la perte osseuse observée à 1 an à la suite d'une castration chimique par anti-aromatase dans une cohorte de patientes ménopausées traitées en adjuvant pour un cancer du sein hormonodépendant<sup>5</sup>. Ensuite, dans la lignée du travail sur le métabolisme énergétique, en partenariat avec le Dr Plotton et le Pr Lejeune (Médecine de la Reproduction, Hospices Civils de Lyon), nous avons identifié, parmi des patients présentant un hypogonadisme périphérique sévère avec oligospermie, un patient avec un syndrome métabolique dont le séquençage du gène *GPRC6A* du récepteur de l'ostéocalcine par l'équipe du Pr Karsenty a montré une mutation F464Y. Ils ont pu démontrer qu'il s'agissait d'une mutation dominante négative responsable d'une absence d'expression du récepteur à la membrane cellulaire établissant ainsi pour la première fois chez l'homme l'action de l'ostéocalcine sur la testostérone et la fertilité. Ils ont également caractérisé l'existence d'un nouvel axe « pancréas(insuline)-os(ostéocalcine)-testicule (testostérone) » régulant la fertilité indépendamment de l'axe hypothalamo-hypophysaire<sup>6</sup>.

1. Yadav VK, Oury F, Suda N, Liu ZW, Gao XB, **Confavreux C**, Klemenhagen KC, Tanaka KF, Gingrich JA, Guo XE, Tecott LH, Mann JJ, Hen R, Horvath TL & Karsenty G. A serotonin-dependent mechanism explains the leptin regulation of bone mass, appetite, and energy expenditure. *Cell* 2009 **138** 976-989.
2. Lee NK, Sowa H, Hinoi E, Ferron M, Ahn JD, **Confavreux C**, Dacquin R, Mee PJ, McKee MD, Jung DY, Zhang Z, Kim JK, Mauvais-Jarvis F, Ducy P & Karsenty G. Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton. *Cell* 2007 **130** 456-469.
3. **Confavreux CB**, Borel O, Lee F, Vaz G, Guyard M, Fadat C, Carlier MC, Chapurlat R & Karsenty G. Osteoid osteoma is an osteocalcinoma affecting glucose metabolism. *Osteoporos Int* 2011.
4. **Confavreux CB**, Szulc P, Boutroy S, Varennes A, Vilaythiou N, Goudable J & Chapurlat R. Serum osteocalcin is associated with metabolic syndrome and abdominal aortic calcifications in older men: the MINOS Study. *Soumis*.
5. **Confavreux CB**, Fontana A, Guastalla JP, Munoz F, Brun J & Delmas PD. Estrogen-dependent increase in bone turnover and bone loss in postmenopausal women with breast cancer treated with anastrozole. Prevention with bisphosphonates. *Bone* 2007 **41** 346-352.
6. Oury F, Ferron M, Xu L, **Confavreux C**, Srinivas P, Lacombe J, Huizhen W, Lugani F, Lejeune H, Kumar TR, Plotton I & Karsenty G. Evidence for a novel pancreas-bone-testis axis favoring male fertility. *Soumis*.