



HAL
open science

Effets des troubles métaboliques et du surpoids liés à l'obésité sur le système musculo-squelettique murin arthrosique ou non : traitement potentiel par vibration corps entier.

Benoît Dechaumet

► **To cite this version:**

Benoît Dechaumet. Effets des troubles métaboliques et du surpoids liés à l'obésité sur le système musculo-squelettique murin arthrosique ou non : traitement potentiel par vibration corps entier.. Médecine humaine et pathologie. Université de Lyon, 2017. Français. NNT : 2017LYSES045 . tel-02080233v1

HAL Id: tel-02080233

<https://theses.hal.science/tel-02080233v1>

Submitted on 26 Mar 2019 (v1), last revised 28 Mar 2019 (v2)

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 NNT : 2017LYSES037

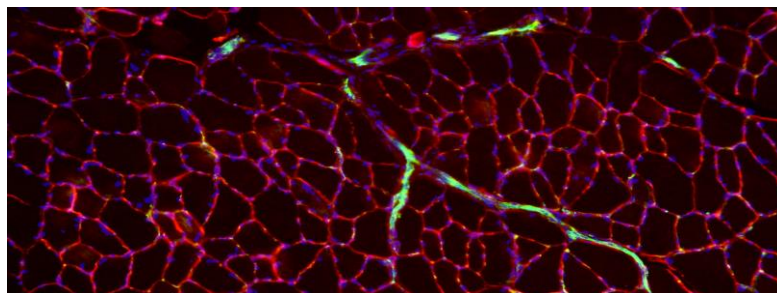
THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON
opérée au sein de
l'Université Jean Monnet de Saint-Etienne

Ecole Doctorale N° 488
Ecole doctorale Sciences Ingénierie Santé EDSIS 488

Spécialité de doctorat :
Sciences de la vie et de la santé

Soutenue publiquement le 6/11/2017, par :
Benoit DECHAUMET

**Effets des troubles métaboliques et du surpoids
liés à l'obésité sur le système musculo-
squelettique murin arthrosique ou non.
Traitement potentiel par vibrations corps entier.**



Devant le jury composé de :

Véronique COXAM – CLERMONT FERRAND, Unité mixte de recherche INRA UMR 1019 - Rapporteur
Eric LESPESSAILLES – ORLEANS, I3MTO EA 4708, IPROS CHR Orléans - Rapporteur
Carole BOUGAULT – LYON, ICBMS UMR CNRS 5246 - Examineur
Marie-Hélène LAFAGE-PROUST – SAINT-ETIENNE, SAINBIOSE, INSERM-U1059 - Examineur
Etienne LEFAI – Examineur – LYON, CarMeN U1060, INRA 1235

Laurence VICO – SAINT-ETIENNE, SAINBIOSE, INSERM-U1059 - Directrice de Thèse

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier l'ensemble des membres du jury, le Dr Véronique Coxam, le Pr Eric Lespessailles, le Dr Carole Bougault, le Pr Marie-Hélène Lafage-Proust et le Dr Etienne Lefai, pour avoir accepté de lire et d'évaluer mon travail de thèse.

Ensuite, je remercie le Dr Laurence Vico, tout d'abord en tant que directrice de l'unité SAINBIOSE Inserm U1059 et de l'équipe de recherche LTBO pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire pour réaliser cette thèse. Je vous remercie également comme directrice de thèse. Tout au long de ces 3 années, vous avez été extrêmement disponible et votre porte à toujours été ouverte afin répondre à mes interrogations, pour parler du projet de thèse, mais aussi de toute autre chose. Je vous remercie également pour votre temps et pour toute l'énergie que vous avez mis pour me guider dans cette thèse.

Je remercie, le Pr Marie Hélène Lafage-Proust et le Dr Alain Guignandon avec qui j'ai découvert les joies de l'enseignement. J'ai eu beaucoup de chance de pouvoir partager avec eux de nombreuses heures de cours. Grâce à vous, je me suis peut-être découvert une vocation à laquelle je n'avais pas pensée. Je remercie doublement le Pr Marie-Hélène Lafage-Proust pour votre implication dans mon projet de thèse, ces nombreuses réunions et « vessel meeting », cela m'a permis de toujours avancer dans mes travaux de thèse.

Je tiens ensuite à remercier, Norbert Laroche avec qui j'ai cohabité quelques mois dans son bureau et ai appris les secrets de l'histologie. Mais aussi Arnaud Vanden-Bossche, pour son aide dans les protocoles de vibrations et d'hypergravité. Le Dr Marie-Thérèse Linossier, pour m'avoir guidé dans la découverte du monde obscur de la biologie moléculaire. Et finalement, je remercie le Dr Bernard Roche pour ses conseils et son temps dans la réalisation des protocoles d'immunologie et pour nous avoir fait découvrir le monde de la navigation.

Ensuite, je remercie l'ensemble des membres permanent du laboratoire, Ingrid Olivier, Sylvie Peyroche, Mirelle Thomas, les Docteurs, Hubert Marotte, Myriam Normand, Maura Strigini et

Luc Malaval. Je n'ai pas eu la chance de travailler avec vous, mais j'ai pu partager de nombreux gâteaux et J-Club tout le long de mon parcours.

Aux anciens doctorants et post-doctorants du laboratoire, Laura, Guillaume, Vasily, Maude et Wafa, un grand merci pour votre accueil chaleureux (surtout toi Wafa), pour n'avoir permis de m'intégrer dans le laboratoire. Je n'oublierais pas tous nos repas ensemble à la cafète de la fac ou de l'hôpital.

A ceux qui sont encore là ou qui arrivent, Vanessa, Guénaëlle, Carmelo et Robin, je vous remercie pour tous ces bons moments que nous avons passés ensemble pendant les repas du midi, les pauses et ces soirées (ou je ne venais certes pas souvent).

A ceux de mon bureau Damien et Mélanie avec qui j'ai passé le plus clair de mon temps. Je remercie surtout Damien, complice dans la thèse avec qui j'ai fait l'ensemble des manips. Je repense aux journées interminables de dissection à l'animalerie ou aux milliers de blocs de MMA que nous avons poncés, coupés et colorés, mais toujours avec l'aide de Jean Jacques et de U2. Je remercie aussi Mélanie pour avoir apporté la bonne humeur dans le bureau. Les séances de baskets ou de lancer d'élastiques sont toujours une source de fou rire.

Je tiens aussi à dire merci à l'ensemble des stagiaires Carine, Cécile, Hugo et Alexandre qui ont émaillé mon parcours de thèse. J'ai beaucoup apprécié travailler et échanger à leur contact, mais surtout manger leurs gâteaux de début et fin de stage.

Je remercie aussi mes anciens maîtres de stage, le Pr Nathalie Perek, les Docteurs Thomas Bourlet et Amandine Gagneux-Brunon, qui m'ont permis d'avancer tout le long de mes études et d'arriver jusqu'à la thèse. Je remercie aussi le laboratoire du LIBM et en particulier le Pr Damien Freyssenet et Anne-Cécile Durieux pour leur aide dans le domaine du muscle, qui était pour moi très obscur et complexe. Je remercie également le laboratoire CarMen U-1060 et en particulier le Dr Etienne Lefai et Stéphanie Chanon avec lesquels j'ai eu la chance de collaborer et qui eux aussi ont apporté un éclairage nouveau sur les résultats et les techniques d'expérimentations utilisées. Finalement, je remercie le Plexan et son personnel, Priscilla Orlando, Ghislaine Roux et Karen Tronchère pour le soin apporté à toutes nos petites

pensionnaires, mais aussi pour leurs aides dans la rédaction difficile des saisines et autres demandes administratives.

Je passe maintenant à mes amis, à vous que je connais depuis plus de 10 ans pour certains. A Anthony, Raphaël, Barthélemy, Aurore, François, Laurence mais aussi Pierre et Hamid, merci de m'avoir soutenu durant toutes ces années d'études, d'avoir écouté mes récits sur l'analyse des images, la coupe de bloc en MMA ou autres, alors que vous ne compreniez même pas de quoi je parlais. Je sais que je peux compter sur vous comme vous savez que je serais là pour vous aussi. Une petite pensée à Mich, Spécu, Faron, Mezzo, Rouge et Jaune, et à tous les autres.

Un petit mot pour un grand merci à toute ma famille, bien sûr mes parents, mes grands-parents, mon frère et ma sœur, merci pour leur soutien sans faille depuis mes premiers jours à la fac et jusqu'à aujourd'hui. Merci d'avoir été là, merci d'avoir compris et accepter les sacrifices que j'ai dû faire pour arriver à cette thèse. Je remercie aussi mes oncles et tantes, cousin et cousines et toutes les personnes qui ont de près ou de loin participer à cela.

Enfin, je remercie, ma femme, Elodie, toi qui m'a connu durant mes premières années de fac. J'ai toujours eu ton soutien quand j'ai décidé de poursuivre en biologie, puis en master et enfin en thèse. Tu as su attendre et comprendre les sacrifices que j'ai dû faire pour cette thèse. Nous allons pouvoir vivre maintenant la vie que nous rêvons et créer notre foyer dont on parle si souvent. Tous les mots ne suffiront jamais pour exprimer ce que je ressens pour toi. Avec toi, j'ai découvert ta famille, ma belle-famille maintenant. Je vous dis à tous (Roselyne, Jean-Pierre, Jean-Michel, Kathy, Coraline, Jérôme, Nathalie, Xavier et Camille) un grand merci.

Un dernier mot pour toutes les souris, cette thèse est en grande partie faite grâce à vous.

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS	1
SOMMAIRE	4
Liste des abréviations	8
Liste des figures	10
Liste des tableaux	13
Introduction générale.....	14
I. Obésité et santé publique	14
II. Appareil locomoteur.....	16
III. Nos objectifs et nos modèles	19
A. Surcharge mécanique et syndrome métabolique sur le système musculo-squelettique d'animaux en conditions non arthrosiques.....	19
B. Surcharge mécanique et syndrome métabolique sur le système musculo-squelettique d'animaux en conditions arthrosiques induites.....	20
C. Contre mesure par vibrations corps entier sur animaux obèses OA ou non.	20
Contexte	21
I. Epidémiologie et caractérisation.....	21
II. Obésité : terrain de nombreuses pathologies.....	22
A. Pathologies cardiovasculaires et de la micro-vascularisation.....	22
B. Cancer.....	24
C. Pathologie de l'appareil locomoteur.....	25
1. Ostéoporose	25
2. L'obésité sarcopénique.....	27
3. Arthrose.....	28
III. Obésité et troubles métaboliques.....	29
A. Microbiote	29
B. Syndrome métabolique	32
1. Hypertension	32
2. Diabète	34
3. Dyslipidémie et stéatose hépatique.....	36
C. Tissus adipeux.....	38
1. Les différents types et rôle des tissus adipeux.....	38
2. Acides gras dans l'Os et les Muscles.....	41

IV. Triade Os-Muscle-Tissus Adipeux.....	45
A. Couplage mécanique et effet de l'hypergravité.....	45
B. Couplage Métabolique	48
1. L'insuline et l'IGF1	48
2. La Leptine	51
3. Cytokines	54
a) Myokines	54
b) Ostéokines.....	58
a) Adipokines.....	63
b) Autres Cytokines.....	67
C. Vascularisation et innervation.....	71
Objectifs et hypothèses.....	73
Matériels et Méthodes.....	75
I. Modèle animal.....	75
A. Animaux et régime	75
B. Mise à mort (MAM).....	76
C. Induction de l'arthrose	76
II. Interventions sur souris vivante	78
A. Modèle d'hypergravité.....	78
B. Vibrations corps entier	79
C. Test de tolérance au glucose.....	80
D. Test de fonctionnalité musculaire	81
III. Récupération des échantillons	82
A. Sur des animaux perfusés au sulfate de baryum	82
B. Sur des animaux non perfusés au sulfate de baryum	83
IV. Analyses des échantillons.....	83
A. Des animaux perfusés au sulfate de baryum	83
1. NanoCT	83
2. Quantifications numériques sur Image J.....	84
3. Histomorphométrie.....	85
B. Sur des animaux non perfusés au sulfate de baryum	87
1. Coupes et analyses des muscles en OCT	87
2. Analyses de biologie moléculaire	90
a) Broyage, extraction et purification de ARN.....	90

b) PCR quantitative	91
c) Analyses sériques	93
V. Analyses statistiques	94
Partie 1 : Validation des modèles.....	96
I. Modèle d'arthrose.....	96
II. Modèle d'obésité	97
III. Discussion	99
Partie 2 : L'obésité pathologique est-elle plus délétère que l'obésité mécanique sur le système musculo-squelettique ?.....	101
I. Résultats.....	101
A. Paramètres métaboliques	101
B. Paramètres osseux	102
C. Paramètres musculaires	105
II. Discussion	110
Partie 3 : L'arthrose post-traumatique aggrave-t-elle les détériorations musculo-squelettiques dans l'obésité pathologique ou l'obésité mécanique ?.....	117
I. Effets de l'OA dans les différents groupes	117
A. Paramètres métaboliques	117
B. Paramètres osseux	119
C. Paramètres musculaires	122
II. L'obésité pathologique est-elle plus délétère que l'obésité mécanique sur le système musculo-squelettique de souris OA	127
A. Paramètres métaboliques et arthrosiques.....	127
B. Paramètres osseux	128
C. Paramètres musculaires	131
III. Discussion	134
Partie 4 : Effets des vibrations corps entiers dans un modèle d'obésité pathologique combinant ou pas une arthrose post-traumatique	139
I. Résultats.....	139
A. Paramètres métaboliques	139
B. Paramètres osseux	140
C. Paramètres musculaires	143
II. Discussion	146
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	150
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	155

ANNEXES.....	173
LISTES DES COMMUNICATION ET PRIX	188
CURRICULUM VITAE	190
RESUME	191

Liste des abréviations

ACE : Angiotensin I Converting Enzyme

Act RIIb : Récepteur Activine IIb

AdipoR : Récepteur à l'adiponectine

ADN : Acide désoxy-ribonucléique

Adrβ2 : Récepteur adrénérgétique β2

AGE : Advanced Glycation End products

Akt : Protéine kinase B

ALP : Alkaline Phosphatase

AMPK : AMP activated protein kinase

Ang-1 : Angiopietin 1

Angptl4 : Angiopietin like 4

APPL-1 : Adaptor protein phosphotyrosine interacting with PH domain and leucine zipper 1

ARN : Acide ribonucléique

ASM : Appendicular Skeletal Muscle index

ATF-4 : Activating transcription factor 4

BAT : Brown Adipose Tissue, Tissu adipeux marron

Ca²⁺ : Ion calcique

CART : Cocaine amphetamine related transcript

cMAT : constitutive Marrow Adipose Tissue, Tissu adipeux constitutif de la moelle

cOCN : Ostéocalcine carboxylée

CREB : C-AMP response element binding protein

DAG : diacyl-glycerol

DMO : Densité minérale osseuse

DXA : Dual energy X ray, absorptiométrie bi-photonique

ERK : Extracellular signal regulated kinases

FAT/CD36 : Fatty acid translocase

FFA : Free Fatty Acid, Acide gras libres

FGF-21/23 : Fibroblast growth factor

Fiaf : Fasting induced adipose factor

FoxO : Forkhead box class O

GDF-1 : Growth differentiation factor 1

GLUT-1, 4 : Transporteurs membranaire de glucose

GPRC6A : G protein coupled receptor family C group 6-member A

HFD : High Fat Diet, régime riche en graisse

HIF-1α : Hypoxia inductible factor 1α,

HOMA-IR : Homeostatic model assessment of insulin resistance

HTA : Hypertension artérielle

IDL : Intermediate density lipoprotein

IGF-1 : Insulin growth factor 1

IGF-1R : Insulin growth factor 1 receptor

IKK : Complexe d'enzyme kinase

IL-1, 6, 10,15 : Interleukine

IMAT : Intermuscular adipose tissue, Tissu adipeux inter-musculaire

IMC : Indice de masse corporelle

IMCL : Intramyocellular lipids, Lipides intramyocellulaires

IR : Insulin receptor

IRS ½ : Insulin receptor substrate

JAKs : Janus Kinase

JNK : Jun Kinase

LDL : Low density lipoprotein

LPA : Acide lysophosphatidique

LPS : Lipopolysaccharide

LRP-5/6 : Low density lipoprotein receptor related protein

M: Mécanique

MAPK/ERK : Voie de signalisation mitogen-activated protein kinases/extracellular signal-regulated kinases),

MAT : Marrow adipose tissue, Tissu adipeux de la moelle

MM : Mécanique et Métabolique

mTOR : Mammalian target of rapamycin

NFATC-1 : Nuclear factor of activated cytoplasmic 1

NF- κ B : Facteur nucléaire κ B

NO : Monoxyde d'Azote

OA : Osteoarthritis, Arthrose (du genou)

OCN : Ostéocalcine

OMS : Organisation mondiale de la santé

OPG : Ostéoprotégérine

PBEF : Visfatine ou Nampt

PGC-1 : Protéine co activatrice de PPAR- γ

PI3K : Phosphatidylinositol 3 kinase

PKA : Protein Kinase A

PKC : Protein Kinase C

PPAR- γ : Peroxisome proliferator activated receptor γ

PTH : Parathyroid hormone

RANK : Receptor activator of nuclease factor kappaB

RANKL : Receptor activator of nuclease factor kappaB ligand

RAS : système angiotensine/rénine

rMAT : regulated Marrow adipose tissue, Tissu adipeux régulé de la moelle

ROS : Reactive oxygen species

Runx2 : Runt related transcription factor 2

SHP2 : PTPN11, Tyrosine protein phosphatase non receptor type 11

SMAD : Mother against decapentaplegic homolog

SNC : Système nerveux central

SNP : Système nerveux périphérique

SOCS-3 : Suppressor of cytokine signaling

STAT : Signal transducer and activator transcription

sWAT : subcutaneous White adipose tissue, Tissu adipeux blanc sous cutané

TG : Triglycerides

TGF- β : Tumor growth factor β

TLR-4 : Toll like receptor 4

TNF- α : Tumor necrosis factor α ,

TSP-1 : Thrombospondine 1

UcOCN : Ostéocalcine décarboxylée

UCP-1 : Thermogénine

VEGF : Vascular endothelial growth factor

VLDL : Very low density lipoprotein

vWAT : Visceral white adipose tissue, Tissu adipeux blanc viscérale

WAT : white adipose tissue, Tissu adipeux blanc

WBV : Whole body vibration, vibration corps entiers

Wnt : Wingless type

Liste des figures

Figure 1 Répartition mondiale de l'obésité.....	14
Figure 2 : Structure osseuse	16
Figure 3 : Structure musculaire	17
Figure 4 : Structure d'une articulation	18
Figure 5 : Mécanismes de la relation entre l'inflammation induite par l'obésité et les maladies cardiovasculaires.....	22
Figure 6 : Schéma représentant les effets de la masse grasse sur la densité minérale osseuse.	27
Figure 7 : Nombre de publication sur le microbiote et le microbiome publiées durant les 20 dernières années.	29
Figure 8 : Schéma récapitulatifs des voies d'actions du microbiote intestinal en lien avec l'induction de l'obésité.....	31
Figure 9 : Voie d'activation de la réponse inflammatoire sous différentes conditions nutritionnelles dans l'obésité.	31
Figure 10 : Deux voies de conceptualisation des symptômes du syndrome métabolique et leur relation	32
Figure 11 : Mécanisme de développement de l'hypertension dans un contexte d'obésité et de syndrome métabolique.	33
Figure 12 : Représentation de la captation du glucose sous insuline.	34
Figure 13 : Mécanismes moléculaires de la résistance à l'insuline par l'insuline elle-même.	35
Figure 14 : Modulation de la sécrétion du tissu adipeux dans des conditions d'hyperplasie.....	36
Figure 15 : Mécanisme de la mise en place de la dyslipidémie et de la stéatose hépatique chez une personne obèse	37
Figure 16 : Induction de la résistance à l'insuline par les acides gras libres (FFA)	37
Figure 17 : Molécules sécrétées par les adipocytes.....	39
Figure 18 : Caractérisation des différents types de tissus adipeux (blanc, brun et beige).	41
Figure 19 : Schéma représentant les différents types d'infiltrations graisseuses dans le muscle.	42
Figure 20 : Modélisation de l'induction de la résistance à l'insuline par les FFA, voie de signalisation mise en place pour inhiber le la voie des transporteurs GLUT4.	43
Figure 21 : Représentation des caractéristiques des rMAT et cMAT dans les os humain et murin.	44
Figure 22 : Mécanostat de Frost (1987) : Evolution du renouvellement du tissu osseux dans différentes conditions de contraintes mécaniques.....	46
Figure 23 : Modèle de régulation de l'insuline sur les ostéoblastes par induction de l'ostéocalcine. .	49
Figure 24 : Schématisation de la voie de l'insuline et de l'IGF-1 pour augmenter la quantité de transporteur de glucose (GLUT4) et d'acide gras (CD36) à la membrane.	50
Figure 25 : Représentation schématique des voies d'induction de la résistance à l'insuline.	51
Figure 26 : Schéma de l'action de la leptine (voie directe et indirecte) sur les cellules osseuses.	52
Figure 27 : Schématisation de l'action directe de la leptine sur les tissus ainsi que les effets obtenus.	53
Figure 28 : Mécanisme d'action par le SNC de la leptine.....	53
Figure 29 : Voies d'activations et d'inhibitions de la myostatine sur les cellules musculaires.	55
Figure 30 : Modélisation de la cascade d'activation de la myostatine par son récepteur ActRIIB sur la perte musculaire.	56

Figure 31 : Induction de l'irisine par l'activité physique et mécanisme d'action sur les WAT pour produire du BAT.	58
Figure 32 : Schéma de la synthèse de l'OCN et de sa gamma-carboxylation dans les cellules ostéoblastiques.	59
Figure 33 : Différentes voies de stimulation conduisant à la production de FGF 21 dans les cellules.	61
Figure 34 : Représentation schématique des interactions de FGF-21 et de son récepteur.....	62
Figure 35 : Voie de signalisation dans les ostéoclastes après une induction par l'adiponectine.	64
Figure 36 : Effet de l'adiponectine sur le métabolisme des lipides et des carbohydrates.....	65
Figure 37 : Variation de la concentration d'IL-6 en fonction des activités (sédentaire, modérée et intense).....	67
Figure 38 : Schématisation des macrophages des TA et des molécules sécrétées.....	69
Figure 39 : Principaux mécanismes d'induction de l'atrophie musculaire et les voies cellulaires mise en œuvre.	71
Figure 40 : Etude de l'appareil musculo-squelettique dans les différentes configurations.....	74
Figure 41 : Représentation schématique des différents groupes d'animaux utilisés dans l'étude (n = 128).....	75
Figure 42 : Articulation du genou pour méniscectomie.vue antérieure.....	77
Figure 43 : Photographie de la centrifugeuse (COMAT Aérospace, Flourens, France) située sur la plateforme d'hypergravité (PLEXAN). Rayon 1m40.	78
Figure 44 : Photographie de l'installation du système de vibration corps entiers. Diamètre plateau des pots vibrants 30cm.	79
Figure 45 : Quantification des adipocytes métaphysaires.	86
Figure 46 : Quantification sur coupes de muscles soléaires.	88
Figure 47 : Quantification des paramètres de l'arthrose.	96
Figure 48 : Caractérisation du modèle d'arthrose sur la partie interne du tibia droit.....	97
Figure 49 : Quantification des paramètres de la stéatose hépatique.....	98
Figure 50 : Caractérisation du modèle d'obésité.	98
Figure 51 : Caractérisation du modèle métabolique.....	101
Figure 52 : Paramètres osseux trabéculaires, métaphyse tibiale.	102
Figure 53 : Paramètres vasculaires et adipocytaires métaphysaires	103
Figure 54 : Paramètres corticaux diaphysaires, Tibia.....	104
Figure 55 : Paramètres de résorption et de formation osseuses dans la métaphyse tibiale.....	104
Figure 56 : Expressions géniques dans la métaphyse tibiale droite.....	105
Figure 57 : Paramètres musculaires généraux.	106
Figure 58 : Paramètres morphologiques du muscle soléaire droit.	107
Figure 59 : Expressions géniques dans le muscle gastrocnémien droit.	108
Figure 60 : Concentration sérique en protéines.....	109
Figure 61 : Caractérisation de l'arthrose.....	109
Figure 62 : Caractérisation du modèle métabolique.....	117
Figure 63 : Caractérisation de l'arthrose.....	118
Figure 64 : Paramètres osseux trabéculaires, métaphyse tibiale.	119
Figure 65 : Paramètres corticaux diaphysaires, Tibia.....	119
Figure 66 : Paramètres de résorption et de formation osseuses dans la métaphyse tibiale.....	120
Figure 67 : Paramètres vasculaires et adipocytaires métaphysaires.	121
Figure 68 : Expressions géniques dans la métaphyse tibiale droite.....	121

Figure 69 : Paramètres musculaires généraux.	123
Figure 70 : Paramètres morphologiques du muscle soléaire droit.	124
Figure 71 : Expressions géniques dans le muscle gastrocnémien droit.	125
Figure 72 : Concentration sérique en protéines.....	125
Figure 73 : Caractérisation du modèle métabolique.....	127
Figure 74 : Caractérisation de l'arthrose.....	128
Figure 75 : Paramètres vasculaires et adipocytaires métaphysaires.	129
Figure 76 : Paramètres osseux trabéculaires, métaphyse tibiale.	129
Figure 77 : Paramètres corticaux diaphysaires, Tibia.....	130
Figure 78 : Paramètres de résorption et de formation osseuses dans la métaphyse tibiale.....	130
Figure 79 : Expressions géniques dans la métaphyse tibiale droite.....	131
Figure 80 : Paramètres musculaires généraux.	132
Figure 81 : Expressions géniques dans le muscle gastrocnémien droit.	133
Figure 82 : Paramètres morphologiques du muscle soléaire droit.	133
Figure 83 : Concentration sérique en protéines.....	134
Figure 84 : Caractérisation du modèle métabolique.....	139
Figure 85 : Caractérisation de l'arthrose.....	140
Figure 86 : Paramètres osseux trabéculaires, métaphyse tibiale.	141
Figure 87 : Paramètres vasculaires et adipocytaires métaphysaires.	141
Figure 88 : Paramètres de résorption et de formation osseuses dans la métaphyse tibiale.....	142
Figure 89 : Paramètres corticaux diaphysaires, Tibia.....	142
Figure 90 : Expressions géniques dans la métaphyse tibiale droite.....	143
Figure 91 : Paramètres musculaires généraux.	144
Figure 92 : Paramètres morphologiques du muscle soléaire droit.	144
Figure 93 : Expressions géniques dans le muscle gastrocnémien droit.	145
Figure 94 : Concentration sérique en protéines.....	146

Liste des tableaux

Tableau 1 : Grilles des scores pour le test de Kondziela modifié.	81
Tableau 2 : Listes des amorces utilisées pour les PCR osseuses et musculaires.....	93
Tableau 3 : Résumé des principaux résultats.	151

Introduction générale

I. Obésité et santé publique

Selon la définition donnée par l’OMS : "L’obésité est définie comme un excès de masse grasse qui entraîne des conséquences néfastes pour la santé". Il s’agit actuellement de la première épidémie mondiale. L’obésité n’est pas homogène dans sa répartition planétaire [Figure 1]. Elle se retrouve principalement au niveau de pays développés (États-Unis, Europe, Australie) mais aussi dans les pays en cours d’industrialisation tel que la Chine, et l’Amérique du Sud. Cela s’explique par un changement radical dans les comportements sociaux et l’apparition d’un mode de restauration rapide, riche en matière grasse et en sucre. La majorité des pays d’Afrique n’est pas encore touchée par l’obésité. La proportion de personnes en surpoids a doublé depuis les années 80 (OMS - "Obésité et surpoids" - Aide-mémoire N°311). En 2008 plus de 35% de la population se trouvait en état de surpoids dont 11% étant considéré comme obèse. La répartition de l’obésité entre les femmes et les hommes n’est pas homogène. En effet, 15% des femmes sont considérées comme obèses en 2014 contre 11% chez les

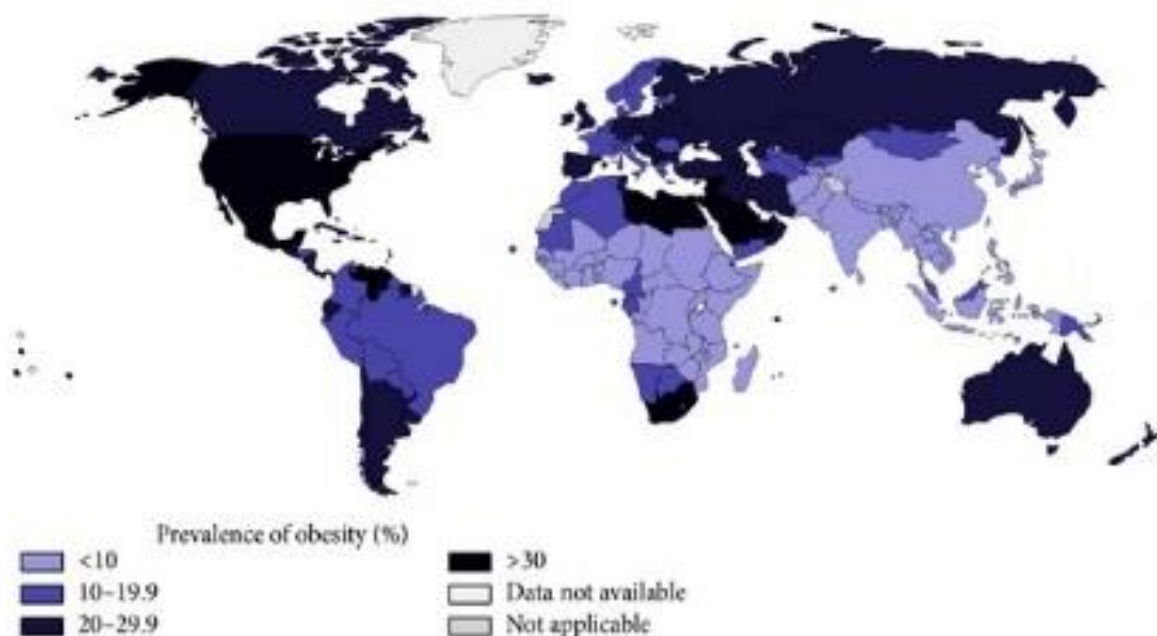


Figure 1 Répartition mondiale de l’obésité

Répartition mondiale de l’obésité en 2008 selon l’O.M.S d’après l’article Gut Microbioma Population: An Indicator Really Sensible to Any Change in Age, Diet, Metabolic Syndrome, and Life-Style de N. Annalisa 2014

hommes[1]. L'évolution du mode vie occidentale tend à faire apparaître de plus en plus précocement l'obésité. A l'heure actuelle, la proportion d'enfants touchée par l'obésité ne cesse d'augmenter. En 2013 dans le monde, il y a plus de 42 millions d'enfants âgés de moins de 5 ans qui présentent les caractéristiques de l'obésité.

Malgré cela, aucune définition pour caractériser l'obésité n'est à ce jour parfaitement décrite. L'indice de masse corporelle (IMC) est aujourd'hui considéré comme l'indice de référence dans la détermination de l'obésité[2]. Il se calcule par le rapport de la masse (en kg) sur la taille (en m²). Les valeurs d'IMC permettent de classer les grades d'obésité[3]. Il y a le surpoids (IMC = 25 à 30 kg/m²), l'obésité de classe I (30 à 35 kg/m²), classe II (35 à 40 kg/m²), classe III (> 40 kg/m²) et dernièrement, une nouvelle catégorie a été créée, les supers obèses (> 50 kg/m²). Cependant, son utilisation pose certains problèmes. Par exemple, l'IMC ne prend pas en compte des paramètres confondants tels que l'âge, le sexe[4], la masse musculaire. Dans la littérature, il a été démontré que chez une femme saine, le taux basal de masse grasse était plus élevé que pour les hommes sains (15-25% contre 8-15% pour les hommes)[5]. Ces variations sont également en lien avec l'origine ethnique. L'influence de l'âge est aussi importante, car en fonction de celui-ci les taux de masse grasse physiologiques augmentent. La mesure d'IMC est donc un critère important, mais à utiliser avec précaution. Certaines études utilisent d'autres critères comme le tour de taille, la répartition des tissus adipeux associés ou non à la présence de troubles métaboliques[6]. Ces paramètres sont plus ou moins faciles à mettre en place pour quantifier l'obésité, certains nécessitent des équipements médicaux spéciaux ce qui limite leur utilisation. En plus des problèmes de santé, se pose un problème de fond tout aussi important : le coût. Aux Etats-Unis par exemple, 21% des dépenses liées à la santé le sont pour des soins relatifs à l'obésité. Plus l'IMC est élevé plus les coûts par patient sont augmentés[7]. Outre l'enjeu de santé publique qui consiste à prévenir, assurer et protéger la santé des personnes, il y a de grands enjeux financiers dans la lutte contre l'obésité pour réduire les coûts nécessaires aux soins sans négliger la prévention.

II. Appareil locomoteur

En analysant, la littérature mondiale, nous avons pu constater que les recherches sur l'appareil locomoteur représentent 10 fois moins d'articles que celles sur les maladies cardiovasculaires. C'est pour cela que nous avons décidé de nous intéresser au système musculo-squelettique.

Chez les espèces vertébrées, il existe un système complexe permettant la mobilité : l'appareil locomoteur. La définition dans le Larousse médical est la suivante : Ensemble des organes permettant de se déplacer, l'appareil locomoteur comprend les os et les articulations des membres et de la colonne vertébrale ainsi que les ligaments, les muscles et les tendons qui les relient où les actionnent.

Les os jouent un rôle de charpente et de soutien du corps. Cependant, seuls, ils sont immobiles. Ils sont aussi les points d'ancrage des muscles, des tendons et des ligaments. Ils ont aussi un rôle de formation de la moelle hématopoïétique. Les os longs sont composés de deux extrémités, les épiphyses proximales et distales contenant de l'os trabéculaire. La partie centrale ou diaphyse est composée d'os cortical. Entre les épiphyses et la diaphyse il y a une zone appelée métaphyse. Sa structure est intermédiaire aux deux autres. Plusieurs types cellulaires (ostéoblastes, ostéoclastes, ostéocytes) interviennent dans l'homéostasie du tissu osseux et permettent la communication entre les différents intervenants [Figure 2]. Les cellules osseuses permettent de réguler le processus de formation/résorption osseuse afin d'adapter

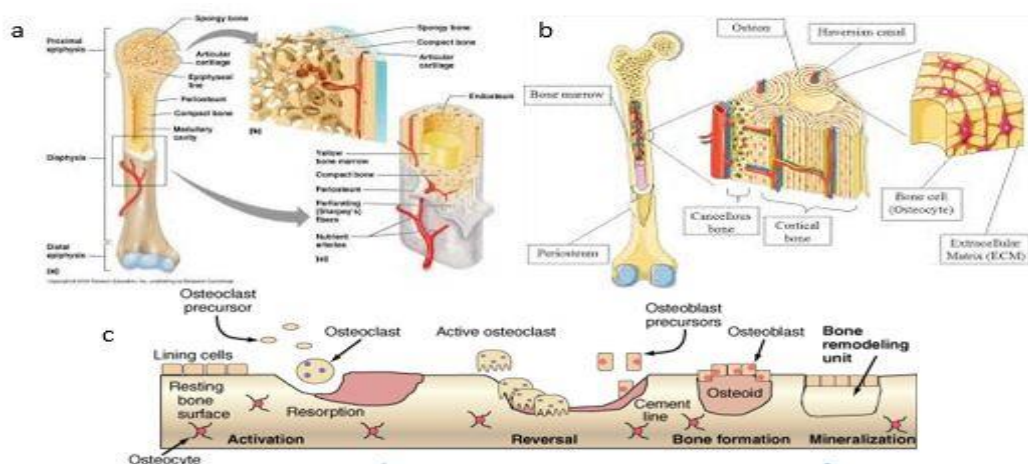


Figure 2 : Structure osseuse

Schéma de la structure d'un tibia (os long), os trabéculaire (a) et cortical (b) ainsi que du cycle de renouvellement de l'os (c)

l'os à son environnement métabolique et mécanique. Les ostéoblastes ont un rôle de formation de l'os, alors que les ostéoclastes sont des cellules impliquées dans la résorption. Les ostéocytes, stade de différenciation ultime des ostéoblastes, sont des cellules emmurées dans l'os et leur rôle de mécano-transduction et hormonal est de mieux en mieux décrit. Dans ce système interviennent aussi les muscles. Leur rôle principal est le mouvement. Attachés à l'os, ils permettent grâce à leur action de contraction/relaxation d'animer le système squelettique. Dans un corps humain ou animal, il existe 3 types de muscles, mais dans le système locomoteur ne sont retrouvés que les muscles dit squelettiques [Figure 3]. Outre l'effet purement mécanique, le muscle peut communiquer avec le reste de l'organisme en produisant des facteurs paracrines ou hormonaux. Les muscles squelettiques s'adaptent aussi aux contraintes mécaniques et métaboliques de l'environnement dans lequel ils se trouvent.

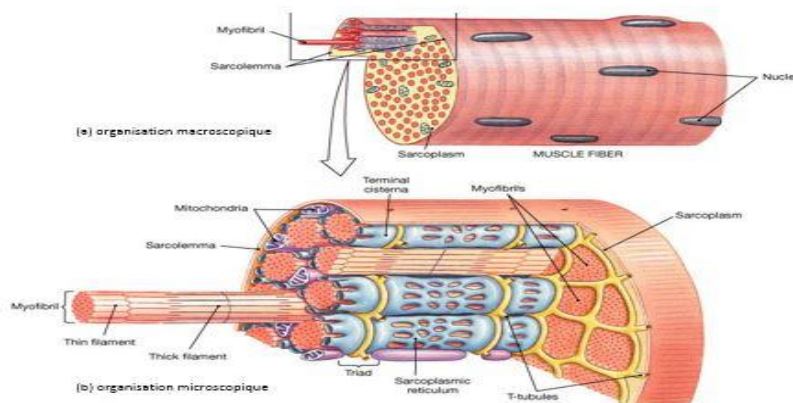


Figure 3 : Structure musculaire

Schéma de la construction macroscopique (a) et microscopique (b) d'un muscle squelettique

La dernière grande structure de système locomoteur est l'articulation. Elle permet le mouvement en tant que tel. Dans le corps, il y a plusieurs types d'articulations (fibreuse, cartilagineuse ou synoviale), elles ne présentent pas la même structure ni la même mobilité. De notre côté, nous allons nous intéresser à l'articulation du genou, une articulation synoviale [Figure 4] qui fait intervenir, l'épiphyse tibiale (proximale) et fémorale (distale), la rotule, les ménisques ainsi que la capsule synoviale. Les surfaces osseuses sont recouvertes d'un cartilage articulaire facilitant les mouvements et protégeant l'os.

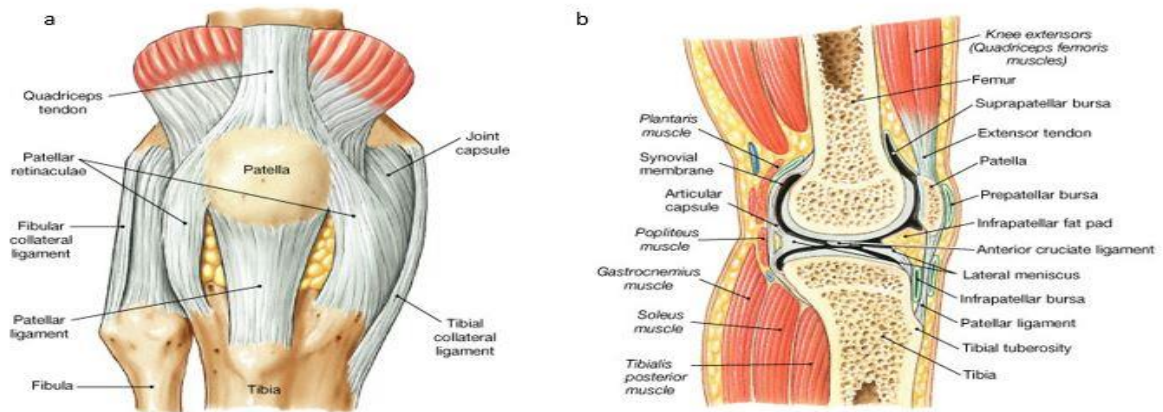


Figure 4 : Structure d'une articulation

Schéma représentatif d'une articulation de genou humain en vue frontale (a) et sagittale (b)

Du fait de sa complexité et du nombre important de structures qui le compose, le système locomoteur est atteint par de nombreuses pathologies. Celles-ci peuvent toucher l'os et l'articulation comme l'ostéoporose, l'arthrose, la polyarthrite rhumatoïde. Elles peuvent toucher le muscle comme les myopathies et autres dégénérescences musculaires. Ces pathologies ou fragilité débutent en affectant d'abord une seule des composantes du système soit sont concomitantes comme l'ostéo-sarcopénie.

III. Nos objectifs et nos modèles

L'objectif global de cette thèse est de mettre en évidence les réponses os-muscle dans différentes conditions pathophysiologiques liées à l'obésité. Pour cela, nous avons mis en place plusieurs modèles murins décrits ci-dessous. L'étude complète est divisée en différentes sous-parties permettant de répondre chacune à une question.

Nous décidons ici et dans tout le reste de la thèse de définir et de distinguer 2 types d'obésité. L'obésité « réelle » qui regroupe les troubles métaboliques ainsi que l'augmentation de la masse grasse et du poids. Nous générons cette obésité par un régime High Fat Diet (HFD) à 60% de matières grasses. L'autre modèle est une obésité dite mécanique qui génère « uniquement » du surpoids. Afin de modéliser ce surpoids, nous utilisons l'augmentation de la gravité à 2g. Grâce à cela une souris pesant 30g (masse moyenne des souris contrôles), aura un poids corporel exercé sur le système musculo-squelettique équivalent à un poids de 60g ($P=m*g$).

L'arthrose étant une complication musculo-squelettique fréquente de l'obésité, nous avons également généré un modèle d'obésité métabolique ou mécanique avec une arthrose chirurgicalement induite.

A. Surcharge mécanique et syndrome métabolique sur le système musculo-squelettique d'animaux en conditions non arthrosiques

Dans un premier temps, nous voulons étudier et comparer ces deux types d'obésité (que nous appellerons par la suite obésité mécano-métabolique ou obésité MM et l'obésité mécanique qui sera l'obésité M). Pour réaliser cela nous utiliserons soit des souris obèses (Ob) qui reproduisent l'obésité et ses conséquences physiques et métaboliques associées[8], soit des souris exposées à l'hypergravité (2g). Nous analyserons les adaptations métaboliques et ostéo-musculaires (y compris leur invasion graisseuse et leur vascularisation) dans les deux cas.

B. Surcharge mécanique et syndrome métabolique sur le système musculo-squelettique d'animaux en conditions arthrosiques induites

Dans un premier temps, nous analyserons les effets de l'arthrose induite chez les animaux normaux (Ctrl vs OA) et soumis à l'obésité MM (MM vs. MM OA) et M (M vs. M OA).

Dans un second temps, nous analyserons, uniquement chez les animaux avec arthrose induite, laquelle des obésités MM ou M a le plus d'effet musculo-squelettique. Nous pourrions évaluer les implications du surpoids seul ou associé aux troubles métaboliques dans l'évolution de l'OA.

C. Contre mesure par vibrations corps entier sur animaux obèses OA ou non.

Nous testerons ensuite si l'utilisation de vibrations corps entier (WBV pour whole body vibration) peut être avantageuse comme contre-mesure dans l'évolution de l'obésité et de l'arthrose. En effet, l'aggravation de l'arthrose entraîne une augmentation de la sédentarité ce qui conduit à une perte osseuse et musculaire encore plus importante et aggrave la prise de poids par accumulation de masse grasse. Ce cercle vicieux va amplifier les effets de l'une et l'autre des pathologies. Le but principal est de trouver une alternative non-médicamenteuse à cette évolution. L'exercice physique reste la meilleure méthode pour lutter contre l'obésité. Mais son applicabilité sur des sujets arthrosiques est complexe. C'est pourquoi les vibrations présentent l'avantage d'être faisables chez des sujets à mobilité réduite.

Contexte

I. Epidémiologie et caractérisation

Comme décrit précédemment, l'obésité se caractérise par une augmentation de la masse grasse et l'apparition dans la majorité des cas, de troubles métaboliques. Le déséquilibre énergétique en faveur d'une augmentation de l'apport en énergie sans variation de la dépense[4] conduit à un accroissement du stockage lipidique dans les tissus adipeux sous-cutané et abdominaux. Le tissu adipeux viscéral est corrélé à l'apparition d'un syndrome métabolique contrairement au tissu adipeux sous cutané[6], mais cette idée est, à l'heure actuelle, remise en cause (cf. partie sur le tissu adipeux). L'évolution des habitudes alimentaires vers une alimentation riche en gras et en sucre et la diminution d'activité physique liée au confort de la vie moderne, ensemble ou séparées influencent ce déséquilibre. Plus rarement, l'obésité peut aussi avoir une origine génétique due à des mutations de gènes codants pour la régulation de la prise de nourriture (leptine, ghréline), ou le stockage lipidique[9].

L'émergence de l'obésité augmente la morbidité et la mortalité. Elle est corrélée à de nombreux facteurs physiopathologiques. L'obésité peut être liée au syndrome métabolique[10], caractérisé par un ensemble de complications telles que diabète de type 2 (résistance à l'insuline et hyperglycémie sanguine), dyslipidémie, stéatose hépatique, hypertension et hypertrophie du tissu adipeux. L'obésité peut aussi être associée à une modification de la composition du microbiote ou de la quantité de micro-organismes[11], [12]. L'obésité peut entraîner des déficiences respiratoires, musculo-squelettiques et favoriser certains cancers[13]. Par ailleurs, on assiste à une invasion dite ectopique de cellules ou dépôt graisseux dans différents organes tels que le muscle ou l'os qui va agir sur leur métabolisme non seulement par une action inflammatoire, mais aussi par la sécrétion d'adipokines[14]. La présence de ces troubles n'est cependant pas toujours observée. Certaines personnes présentant un ou plusieurs de ces critères[15] voir aucun. Si l'obésité est définie comme un excès de masse grasse, son phénotypage est donc complexe.

II. Obésité : terrain de nombreuses pathologies

A. Pathologies cardiovasculaires et de la micro-vascularisation

La relation entre le tissu adipeux et le système vasculaire (cœur, artères, veines) est importante et la communication est incessante. Le tissu adipeux secrète de nombreuses adipokines ayant un rôle soit protecteur (adiponectine, leptine si l'augmentation est aiguë) soit négatif (leptine lorsque l'augmentation est chronique, résistine, chémérine et vaspine). La balance effets protecteurs/effets délétères penche en faveur du rôle protecteur chez des personnes en bonne santé et inversement en cas d'augmentation de masse grasse[16], ce qui est le cas pour l'obésité.

Comme décrit précédemment, l'obésité conduit à de nombreuses pathologies du fait des modifications importantes dans l'homéostasie de l'organisme. Les maladies cardiovasculaires par infiltration de macrophages inflammatoires[17] d'un côté et augmentation du stress oxydatif systémique de l'autre [Figure 5][16] sont fréquemment liées à l'obésité. L'augmentation de tissus adipeux et de macrophages conduisent à l'augmentation de la sécrétion de cytokines inflammatoires, telles que l'IL-6, l'IL-1 et le TNF- α [18]. Ces cytokines ont le pouvoir d'activer directement ou indirectement (par le foie), le système inflammatoire. Celui-ci va ensuite agir

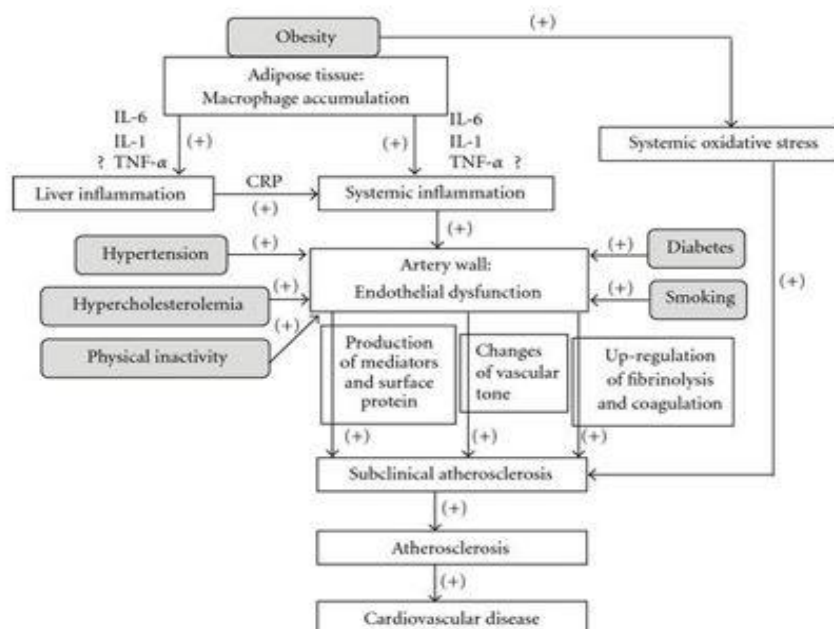


Figure 5 : Mécanismes de la relation entre l'inflammation induite par l'obésité et les maladies cardiovasculaires
D'après la revue Inflammation, a Link between Obesity and Cardiovascular Disease, Z Wang, Mediators of inflammation, 2010.

sur l'ensemble de la vascularisation. Les cytokines vont induire des modifications dans la structure même des vaisseaux (production de protéines de surface, changement de tonicité vasculaire par exemple)[16]. L'augmentation de tissu adipeux conduit lui aussi à une augmentation de gras circulant (LDL, VLDL, IDL) néfaste pour l'organisme entraînant la formation de plaque d'athérome dans les artères.

L'influence de l'obésité sur les maladies cardiovasculaires se fait aussi de manière indirecte par l'augmentation de l'hypertension, de la lipidémie, du diabète, mais aussi de l'inactivité physique[16].

En plus des pathologies cardiovasculaires, l'obésité conduit à des modifications importantes au niveau de la micro-vascularisation. Ces modifications touchent principalement le tissu adipeux. En effet celui-ci augmente rapidement et donc nécessite une vascularisation adéquate. Mais l'angiogenèse dans le tissu adipeux nouvellement apparu ne se fait pas assez rapidement et de nombreuses zones sont soumises à des conditions d'hypoxie[19]. Le manque d'oxygène et de nutriments pour les cellules entraînent une augmentation des facteurs hypoxiques (HIF-1 α), inflammatoires (IL-6, TNF) et la production d'adipokines (leptine et résistine). Tous ces facteurs vont aussi agir à distance et moduler la micro-vascularisation générale, la rendant plus perméable et plus fragile[20]. Dans d'autres tissus du corps, comme le rein ou le foie, la micro-vascularisation est altérée et engendre des pathologies graves[21]. L'augmentation de l'inflammation dans le sang conduit à une diminution de la micro-vascularisation musculaire et réduit la surface d'échange entre les capillaires et les fibres. Cela est un facteur de la résistance à l'insuline[22]. En effet chez des personnes diabétiques, il a été montrée que la résistance à l'insuline et au glucose ainsi que l'inflammation sanguine conduisaient à une perte importante des péricytes et une augmentation de la perméabilisation des parois vasculaires. Cela entraîne une fuite du plasma et de ces composants créant ainsi une dégénérescence de la zone[23], [24].

Les pathologies impliquant les voies vasculaires sont donc importantes dans la mise en place de l'obésité et son aggravation.

B. Cancer

L'obésité impacte de façon importante le développement de nombreux cancers (cancers colorectaux, cancers touchant le système digestif ou encore la prostate ou les poumons[25]). Suivant le site anatomique touché, les probabilités que l'obésité ait une implication varient fortement. En effet, pour un cancer de la prostate seulement 4,5% des cas sont attribués à l'obésité, inversement plus de 80% des cas de cancers colorectaux sont imputés à l'obésité. Chez la femme, 40% des cancers endométriaux sont associés à un surpoids ou à une obésité. Cette hétérogénéité s'explique par la proximité et la communication des tissus affectés avec les tissus adipeux[26]. Des études ont mis en évidence une corrélation entre l'IMC et le risque de décès dû au cancer[26]. Arriver à conserver une valeur d'IMC en dessous de 25kg/m² permettrait chaque année d'éviter l'apparition de 100 000 nouveaux cas de cancer[13]. Aux Etats-Unis, 15 à 20% des personnes décédés à cause du cancer sont en surpoids ou obèses. De nombreuses recherches ont montré le rôle de l'obésité et son implication dans les mécanismes cellulaires tumoraux du cancer. Les principales voies sont :

- Augmentation des facteurs de croissance telle que l'insuline ou IGF-1
- Augmentation des hormones stéroïdes sexuelles comme les estrogènes systémiques
- Déstabilisation de la balance énergétique par modification de la sécrétion des adipokines et cytokines
- Création d'un environnement inflammatoire de bas grade et augmentation du stress oxydatif
- Altération du microbiote et plus spécifiquement celui de l'intestin

Ces paramètres jouent favorablement sur le développement des cellules tumorales. L'obésité par de nombreux processus souvent indirects joue donc un véritable rôle dans le développement des cancers et plus le grade de l'obésité est important plus le risque de cancers sera élevé. En plus de favoriser leur mise en place, elle diminue l'efficacité des traitements, car il est plus difficile de trouver les bons dosages de chimiothérapies lorsque l'obésité est importante. Le tissu adipeux atténue les effets des traitements en diluant leur efficacité.

C. Pathologie de l'appareil locomoteur

L'obésité impacte l'ensemble du corps y compris l'appareil locomoteur. Il faut distinguer l'effet du surpoids, c'est-à-dire l'augmentation de charge appliquée au système musculo-squelettique et l'effet des altérations métaboliques. Ces deux mécanismes pourraient présenter des effets opposés. Les pathologies les plus fréquemment associées au système musculo-squelettique sont l'ostéoporose, la sarcopénie et l'arthrose. Ces 3 pathologies seront décrites d'un point de vue clinique ci-dessous, les aspects biologiques seront étudiés plus loin dans le texte.

1. Ostéoporose

Dans le monde plus de 200 millions de personnes, surtout des personnes âgées et principalement des femmes (53% des femmes ont des chances de devenir ostéoporotiques après 50 ans contre 20% des hommes)[27] sont atteintes par l'ostéoporose. Cette maladie se définit par une perte de masse osseuse et une détérioration de la microarchitecture osseuse qui augmentent le risque de fracture. De plus, la qualité de l'os, plus difficile à mesurer que la perte osseuse, est diminuée. Cette baisse peut, elle aussi conduire à des risques de fracture accrus. La détection de l'ostéoporose se fait le plus souvent par absorptiométrie biphotonique (DXA) qui fournit une mesure de la densité minérale osseuse surfacique (DMO). Si celle-ci passe sous un certain seuil (T-score calculé en fonction de l'âge et du sexe) alors, la personne est considérée comme ostéoporotique. De plus la DXA est utilisée pour la mesure de la composition corporelle. Cependant chez les sujets en surpoids ou obèses, la précision des mesures osseuses diminue en fonction de l'augmentation des masses grasses. D'une part ces masses grasses – surtout abdominales – sont hétérogènes, d'autre part elles éloignent la source de rayons-x de la pièce osseuse (vertèbres lombaires ou extrémité supérieure du fémur)[28].

Malgré ces limites, on sait que dans les premiers stades de l'obésité, la DMO augmente parallèlement au poids. Mais au-delà d'un certain seuil, le poids continue à augmenter alors que la DMO non. C'est à partir de ce moment-là que l'os devient plus fragile et que les fractures apparaissent[29]. Cela montre bien l'incidence de l'ostéoporose chez des personnes en état d'obésité. En effet dans une étude de Sornay-Rendu et al[30], les auteurs ont montré que malgré l'augmentation de la DMO osseuse dans de l'obésité, celui-ci n'était pas suffisante

pour compenser la prise de poids. Les zones de fracture chez les obèses ne sont pas les mêmes que pour des personnes saines. Certains sites telle la hanche sont protégés en cas d'obésité alors que les articulations porteuses sont plus susceptibles de subir des fractures. En effet la relation IMC - risque de fracture n'est pas linéaire : plus l'IMC est proche de 25 à 30 kg/m², plus les risques de fractures sont diminués alors qu'avec une IMC supérieur à 30 kg/m², les risques de fracture augmentent linéairement avec le poids. De très nombreuses études telles que Caffarelli et al[31] ou Compston et al[29], [32] mettent en évidence l'augmentation du risque de fracture avec l'obésité. Il y a donc un vrai enjeu clinique à mieux comprendre les mécanismes sous-jacent de l'obésité dans l'ostéoporose.

En plus d'agir sur la densité osseuse, l'obésité influence les mécanismes cellulaires impliqués dans les voies d'activation et d'inhibition des ostéoblastes et ostéoclastes. Dans les conditions normales, il y a un équilibre entre résorption (ostéoclaste) et formation (ostéoblaste) afin de maintenir l'os dans une situation optimale d'utilisation. Dans l'ostéoporose, la balance formation/résorption est déplacée vers une augmentation de la résorption et donc de perte osseuse. En cas d'obésité, plusieurs profils ont été décrits (obésité avec ou sans syndrome métabolique) qui pourraient être en lien avec le type d'obésité, en particulier la sévérité du syndrome métabolique qui paraît être lié à un effondrement des activités cellulaires osseuses, en particulier de la résorption osseuse[33]. La revue de Roy et al.[34] décrit l'état de l'art, en particulier les modifications des voies ostéoclastiques et ostéoblastiques et expose les questions non encore résolues.

Si les effets métaboliques engendrent une fragilisation osseuse, le surpoids seul, pourrait induire un effet protecteur dans une certaine proportion. En effet, une étude a mis en évidence[35] une stimulation de la formation osseuse par augmentation de la charge. Mais, là encore, cet effet n'est pas linéaire, la courbe est une parabole inversée [Figure 6]. Les effets sont bénéfiques jusqu'à ce que la masse grasse atteigne environ 33% de la masse totale. Ensuite, les effets des troubles métaboliques seraient majoritaires et leur effet prédomine.

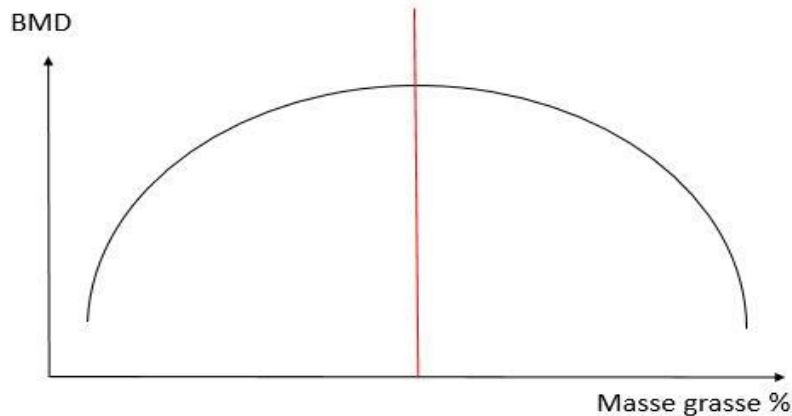


Figure 6 : Schéma représentant les effets de la masse grasse sur la densité minérale osseuse.

2. L'obésité sarcopénique

La sarcopénie est une fragilité musculaire. Sa définition a été plusieurs fois modifiée et remise à jour. La plus commune[36] décrit la sarcopénie comme étant une diminution de la masse et de la force musculaire avec l'âge. Elle est associée à de nombreux dysfonctionnements métaboliques et physiologiques. Pour la mesurer, plusieurs méthodes de quantification ont été proposées. La plus couramment utilisée est l'index « ASM » pour Appendicular Skeletal Muscle index (masse musculaire en kg/taille² mesurer par DXA). L'incidence de cette fragilité est de 15 à 25% pour des personnes de moins de 70 ans et de plus de 50% pour des personnes dont l'âge est supérieur à 80 ans[37]. La définition de la frontière entre état pathologique et fragilité liée au vieillissement est tout l'enjeu actuel.

Avec l'augmentation importante de l'obésité au niveau mondial, un nouveau type de sarcopénie a été décrit, il s'agit de l'obésité sarcopénique[38]. Elle se définit par une augmentation de masse grasse globale mais aussi intramusculaire et une diminution de masse musculaire. Il a été montré que l'obésité sarcopénique combine les risques liés à l'obésité (troubles métaboliques) et à la sarcopénie (pertes musculaires)[39]. Les deux pathologies s'entraînent dans un cercle vicieux. En effet, l'obésité conduit à une augmentation des tissus adipeux qui engendre la production de cytokines inflammatoires. Le corps réagit en développant un syndrome métabolique. L'enchaînement de ces mécanismes va conduire à une perte de masse, force et taille des muscles, mais aussi à une accumulation de gras intramusculaire sous différentes formes. Cliniquement cette fragilité musculaire va induire une diminution d'activité physique, sans diminution de la prise alimentaire ce qui déplace la balance énergétique vers un excès. Les taux des myokines cataboliques (comme la

myostatine[39]) et cytokines inflammatoires (IL-6 ou TNF- α [40]) sécrétées par le muscle vont aussi être augmentés, renforçant les troubles métaboliques et créant ainsi un cercle vicieux.

Les tissus adipeux et les muscles sont des organes importants dans les mécanismes énergétiques et inflammatoires. Une anomalie dans un de ces tissus engendre un dérèglement dans l'ensemble du corps[37].

3. Arthrose

L'arthrose (OA) est une maladie ostéo-articulaire avec un impact de plus en plus important dans le monde. Elle affecte environ 12% de la population entre 25 et 65 ans et son incidence augmente de 40 à 70% pour les personnes de plus de 65 ans suivant les études[41]. Malheureusement, aucun traitement efficace n'est disponible à l'heure actuelle. Cependant pour mieux comprendre cette pathologie, de nombreuses techniques d'imageries ont été développées. Ces nouvelles techniques permettent de visualiser de manière précise et fonctionnelle les zones arthrosiques[42]. Selon l'OMS « l'arthrose est la résultante des phénomènes mécaniques et biologiques qui déstabilisent l'équilibre entre la synthèse et la dégradation du cartilage et de l'os sous chondral ». Il se met aussi en place une inflammation de bas grade autour de l'articulation par l'activation de l'immunité innée et des macrophages[43]. L'arthrose se caractérise aussi par une vascularisation du cartilage articulaire[44], [45] normalement avasculaire et une augmentation de la densité vasculaire de l'os sous-jacent. De plus des ostéophytes, excroissances osseuses richement vascularisées et contenant une moelle adipocytaire, apparaissent à la périphérie de l'articulation. Chez l'humain la gonarthrose, comme d'autres sites d'arthrose, a de multiples origines (par exemple, post-traumatique, génétique, métabolique, ou biomécanique), générant de multiples phénotypes. De plus, il existe une variabilité considérable dans l'évolution de la maladie, qui peut progresser rapidement ou par paliers. Enfin la perception de la douleur est également très hétérogène.

L'obésité agit comme un catalyseur de l'arthrose en induisant ou en accentuant l'ensemble de ces effets. La prévalence de l'OA passe de 25-30% en moyenne chez des individus sains à plus de 60% chez des individus obèses[46]. L'obésité agit de plusieurs manières sur l'articulation. D'abord par le biais mécanique avec l'augmentation du poids, cet effet peut alors être bénéfique en renforçant la structure osseuse[35]. Mais dans les cas d'arthrose installée, une

surcharge sur l'articulation conduit à une instabilité de l'ensemble de la zone arthrosique et à l'apparition de faiblesses au niveau des tissus périphériques[47],[48]. Une prise de poids importante réduit aussi l'activité physique. Ces deux actions fragilisent le système musculo-squelettique et aggravent le syndrome arthrosique[43]. L'hyperglycémie associée au diabète augmente les AGE (Advanced Glycation End products, qui sont des protéines ou des lipides glycosylés), entraînant un stress oxydatif, une inflammation systémique et une détérioration musculaire et osseuse en lien direct avec l'OA[47].

III. Obésité et troubles métaboliques

A. Microbiote

La compréhension et la connaissance du microbiote [Figure 7] sont en pleine expansion [49]. Le microbiote intestinal intervient dans de nombreux processus bénéfiques (régulation de la prise alimentaire, mise en place du système immunitaire par exemple) ou néfastes en cas de trouble important (inflammation, dérèglement du métabolisme global).

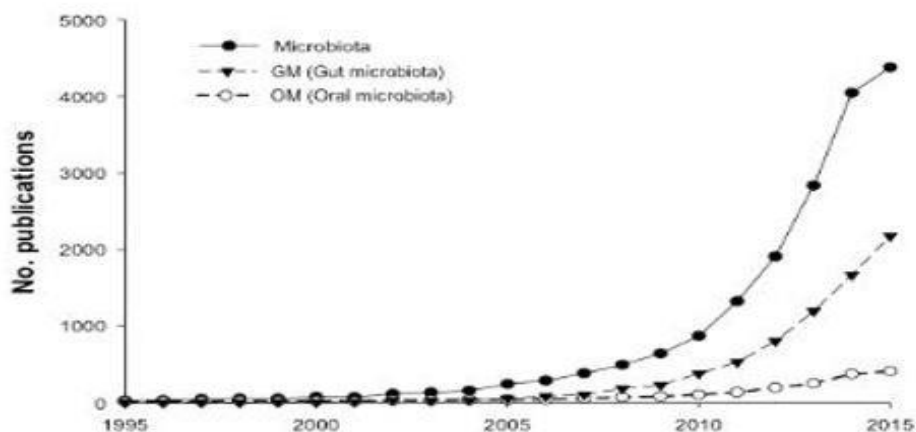


Figure 7 : Nombre de publication sur le microbiote et le microbiome publiées durant les 20 dernières années.
D'après The potential impact of gut microbiota on your health: Current status and future challenges, S. Sirisinha, 2016

Le microbiote intestinal regroupe 4 types d'organismes différents. L'hôte avec qui le microbiote cohabite, se trouve dans un état de symbiose presque parfaite. Les deux parties évoluent ensemble, permettant ainsi à chacun de tirer les bénéfices de l'autre sans pour autant perdre les avantages qu'ils possédaient déjà[49]. Dans les conditions normales, le

microbiote évolue durant toute la vie de l'hôte. Il est présent dès la naissance jusqu'à la mort. Cependant, une petite modification de cet équilibre peut conduire à une multiplication anarchique du nombre ou du type d'organismes présents, ou inversement à son effondrement. Cela impacte donc la symbiose existante.

Parmi les micro-organismes, il y a les bactéries, près de 1000 espèces différentes, dont les principales familles sont *actinobacteria*, et *proteobacteria*. Le nombre de bactéries représente moins de 10^{-6} % du nombre de cellules du corps humain. Il y a aussi les *archaea*, (organismes vivants unicellulaires sans noyau ni organite), ils sont en quantité très faible par rapport aux bactéries. Les methanogènes sont la famille la plus représentée de ces organismes. Le microbiote comprend également des champignons et en particulier les levures telles que les *candidas* et des virus comme les bactériophages.

L'obésité joue un rôle important dans la modulation du microbiote intestinal qui en retour influence la mise en place de l'obésité. Une alimentation riche en graisse et en sucre modifie la diversité du microbiote. Par exemple chez les bactéries, les *bacteroidetes* diminuent alors que les *actinobacteria* et les *firmicutes* augmentent[11], [50]. Ces modifications impactent l'ensemble des métabolismes du corps.

Dans l'obésité, les changements dans la composition du microbiote conduisent à une augmentation de la captation des aliments et de la prise énergétique. Cela module aussi les échanges avec le système nerveux central (SNC) et la régulation des hormones impliquées dans la satiété[51]. De plus, le SNC inhibe les voies d'oxydation des acides gras dans les muscles et le cerveau [52]. Il en résulte une augmentation de la synthèse des triglycérides et du cholestérol. Le microbiote favorise aussi le stockage du gras dans le tissu adipeux par la voie Angptl4/Fiaf[53] ou par la voie des carbohydrates. En cas d'obésité, il y a une augmentation de cette voie dans les tissus adipeux [54] [Figure 8].

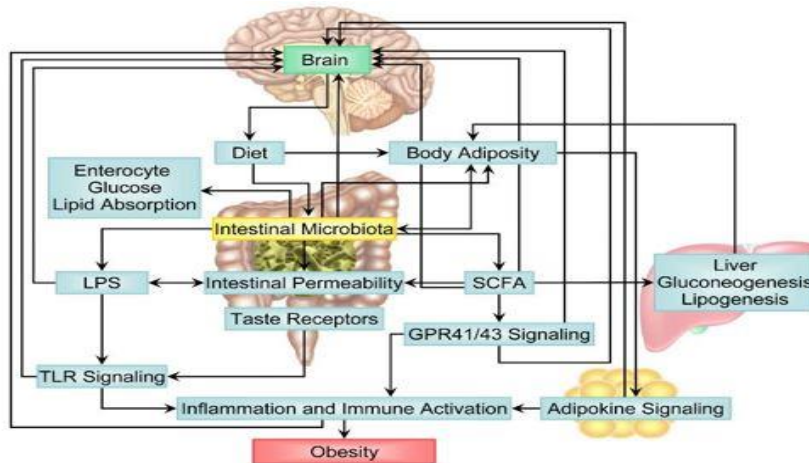


Figure 8 : Schéma récapitulatif des voies d'actions du microbiote intestinal en lien avec l'induction de l'obésité. D'après Gut Microbiome and Obesity: A Plausible Explanation for Obesity, Sanmiguel, 2015

Le changement dans la composition du microbiote conduit à la production de LPS, qui va pouvoir passer la barrière endothéliale et se fixer sur les TLR-4 des macrophages et autres cellules immunitaires [Figure 9]. Cela va activer les voies conduisant à la mise en place d'une inflammation systémique. Les taux élevés de LPS dans le sang sont associés à l'obésité et par conséquent à la résistance à l'insuline et à la leptine qui en découlent[55]. Cela va aussi entraîner la mise en place d'une inflammation au niveau des tissus adipeux qui génèrent par la suite une inflammation systémique à bas bruit[56].

Le microbiote joue donc un rôle fondamental dans la régulation du corps dans son ensemble, mais plus particulièrement dans la mise en place et le maintien de l'obésité.

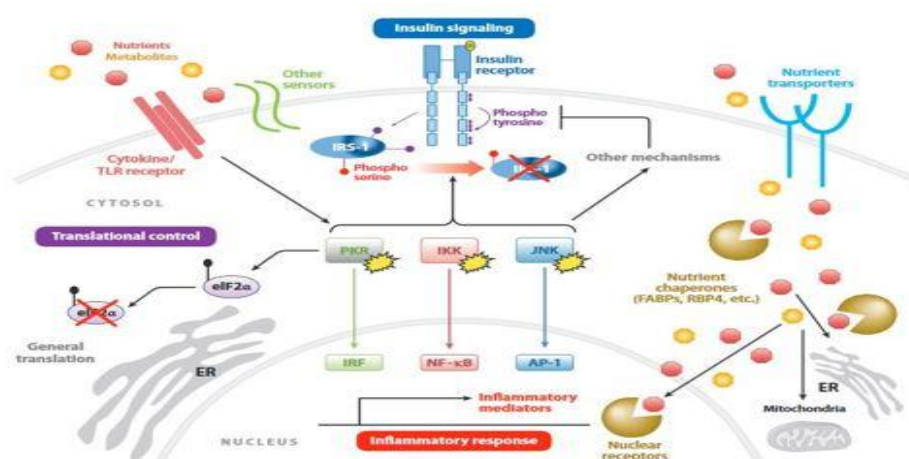


Figure 9 : Voie d'activation de la réponse inflammatoire sous différentes conditions nutritionnelles dans l'obésité. D'après Inflammatory Mechanisms in Obesity, M. F. Gregor, Nature, 2011

B. Syndrome métabolique

Dans la majorité des cas d'obésité chronique, se mettent en place des troubles métaboliques. Ces troubles sont regroupés sous l'appellation de « syndrome métabolique ». Pour définir une obésité pathologique il est souvent demandé de valider au minimum 3 des 4 critères du syndrome métabolique. Les critères sont : l'hypertension artérielle, le diabète de type 2 (résistance à l'insuline et au glucose), la dyslipidémie (augmentation de TG et de cholestérol sanguin) et la stéatose hépatique. L'augmentation des masses graisseuses est aussi prise en compte même si elle n'est pas un critère de base. Il existe deux concepts de syndrome métabolique dans la littérature. Celui défini par l'OMS, où la résistance à l'insuline est le maillon central et la résultante des autres troubles. Cependant, un autre modèle, défini dans la littérature place tous les acteurs sur un même pied d'égalité[57] et chacun influence à part égale les autres symptômes [Figure 10].

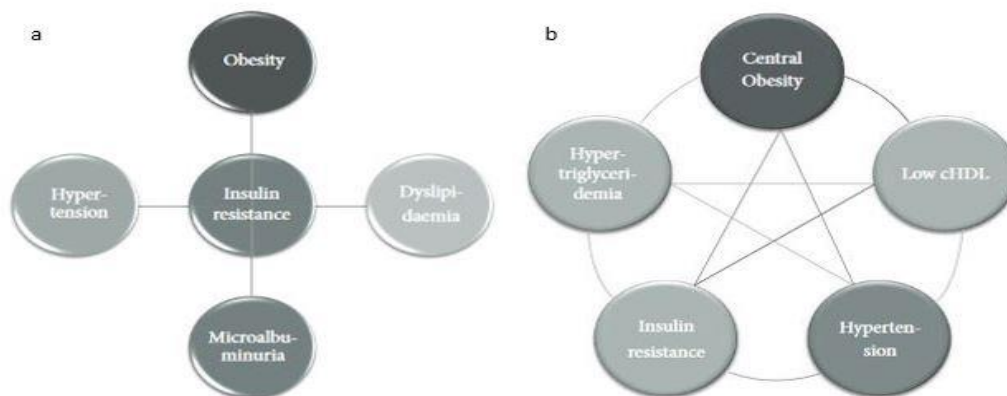


Figure 10 : Deux voies de conceptualisation des symptômes du syndrome métabolique et leur relation

En (a) la vision définie par l'OMS et en (b) une vision émergente. D'après Y Mendizábal dans International Journal of Hypertension 2013

1. Hypertension

Le 1^{er} des 4 critères décrit ici est l'hypertension artérielle (HTA). L'HTA est une maladie multifactorielle influencée par une prédisposition génétique, mais surtout par un environnement favorable à son développement. L'obésité serait responsable de près de 80% des HTA pour les hommes et de 65% pour les femmes. Elle conduit à des arrêts cardiaques, des infarctus du myocarde, des maladies artérielles périphériques, des troubles rénaux.

Des études ont mis en évidence une relation entre la résistance à l'insuline et l'hypertension artérielle. Plus de 50% des personnes présentant une HTA sont résistantes à l'insuline[58], [59]. Le système rénine / angiotensine (RAS) [60] a pour rôle de réguler la pression artérielle, le volume sanguin et la balance sodium/potassium. Or l'augmentation des tissus adipeux favorise la production de l'angiotensine II (produit par l'Angiotensin I Converting Enzyme (ACE)), augmente le ratio rénine / angiotensine et conduit à une HTA par augmentation de la pression et du volume[59]. Ce mécanisme bien que majoritaire n'est pas le seul. En effet, l'augmentation de tissu adipeux viscéral accentue la présence de cholestérol et TG dans la circulation sanguine. Cela risque de rigidifier les artères et créer des plaques d'athéromes, ces phénomènes conduisent le cœur à augmenter la pression sanguine afin de maintenir un fonctionnement normal causant ainsi une HTA chronique[61]. Le tissu adipeux joue un rôle important dans la mise en place de l'HTA par la sécrétion de nombreuses adipokines telles que la leptine (agit sur les cellules endothéliales en altérant leur fonctionnement), la résistine et la visfatine (interviennent dans le mécanisme de la vasodilatation par action sur le NO) ou par la sécrétion de cytokines inflammatoires comme l'IL-6 et le TNF- α qui génèrent une production de ROS, délétères pour les cellules endothéliales par les canaux Ca^{2+} [57].

L'ensemble de ces modifications est favorable au développement de l'HTA[62] [Figure 11].

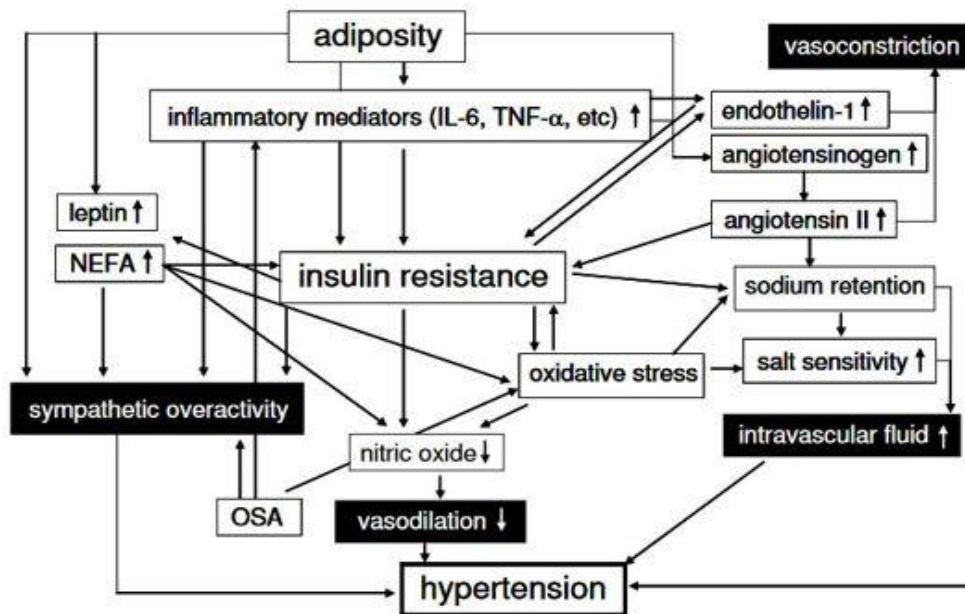


Figure 11 : Mécanisme de développement de l'hypertension dans un contexte d'obésité et de syndrome métabolique. D'après H Yanai dans Nutrition Journal, 2008

2. Diabète

Un des critères les plus représentatifs et plus connus de l'obésité est sans aucun doute le diabète. Nous ne parlons pas ici du diabète gestationnel, atteignant uniquement les femmes au cours de la grossesse et qui se résorbe ensuite, ni du diabète de type 1, maladie auto-immune qui se caractérise par la destruction des cellules β du pancréas par les cellules de l'immunité. Nous nous intéressons ici au diabète de type 2 qui se caractérise par une résistance à l'insuline, au glucose et un épuisement des cellules β du pancréas. Ce diabète est causé par une sur-stimulation des cellules productrices d'insuline.

Son incidence est de 5 à 10% en Europe et son augmentation est telle que l'OMS prédit que plus d'une personne sur 3 sera diabétique en 2050[63]. La résistance à l'insuline et au glucose sont les deux facteurs de détermination principaux. Lors de l'obésité, la balance énergétique est modifiée par un apport supérieur à la dépense. Cet excédent doit être stocké par le corps, d'où une augmentation de la captation des sucres, lipides, protéines dans le sang. Pour le glucose, les principaux utilisateurs sont les muscles et le cerveau (consommateurs) et les tissus

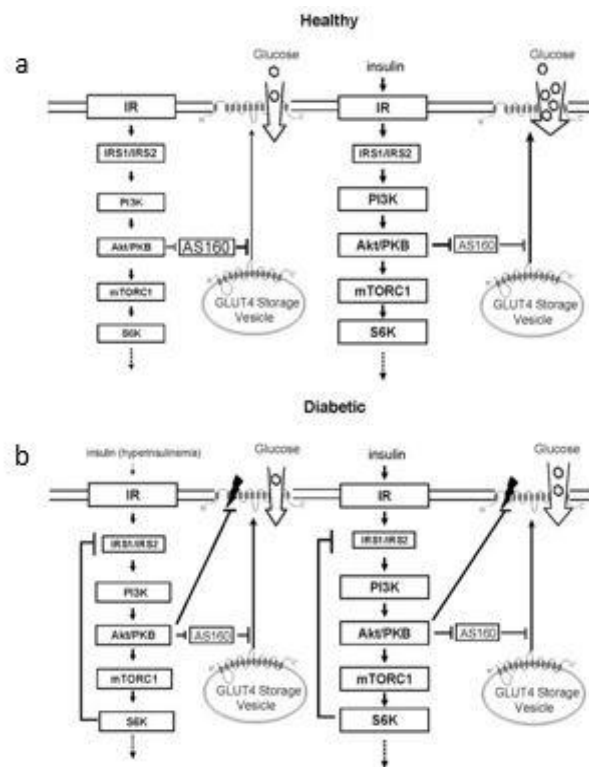


Figure 12 : Représentation de la captation du glucose sous insuline.

Dans des conditions normales (a) et dans des conditions diabétiques (b). D'après Y. Zhu, *Molecul Endocrinol*, 2013

adipeux (stockages sous forme de TG). Dans les conditions normales, une hyperglycémie conduit à une entrée de glucose dans les cellules musculaires en présence d'insuline [Figure 12]. L'insuline se fixe sur son récepteur et active l'augmentation de GLUT-4 (transporteur membranaire du glucose) à la surface cellulaires[64]. Le glucose peut donc entrer dans la cellule et disparaître de la circulation. Une hyperglycémie active la production d'insuline par les cellules pancréatiques. Un rétrocontrôle se fait aussi pour stopper la production d'insuline une fois que celle-ci n'est plus nécessaire. En cas d'obésité, il y a un taux de glucose sanguin élevé de façon chronique. Ce taux est dû à l'apport nutritionnel mais aussi au relargage des acides gras libres (FFA) par le tissu adipeux[65]. Cela conduit à une sur-stimulation des ilots β pancréatiques produisant l'insuline. Dans un premier temps, les tissus parviennent à absorber le glucose sanguin, et on observe un taux de glucose normal, mais un taux d'insuline élevé[66]. Avec le temps, le taux de glucose ne parvient plus à être régulé générant une hyper-insulinémie et hyper-glycémie chroniques. Les cellules bêta pancréatiques vont s'épuiser et mourir[67]. De plus, la présence d'une hyper-insulinémie pré-diabétique (avant la résistance au glucose) entraîne de nombreuses modifications en particulier au niveau des tissus adipeux. Comme, décrit précédemment, une partie du glucose non utilisée est stockée sous forme de TG dans le gras viscéral majoritairement. Ce gras va ainsi augmenter, produire du TNF- α qui agit comme facteur de stress oxydatif et production de ROS, eux-mêmes impliqués dans la production d'insuline et la résistance au glucose et à l'insuline [Figure 13][68]. Le processus entre donc dans un cercle vicieux qui va agir sur les autres paramètres du syndrome.

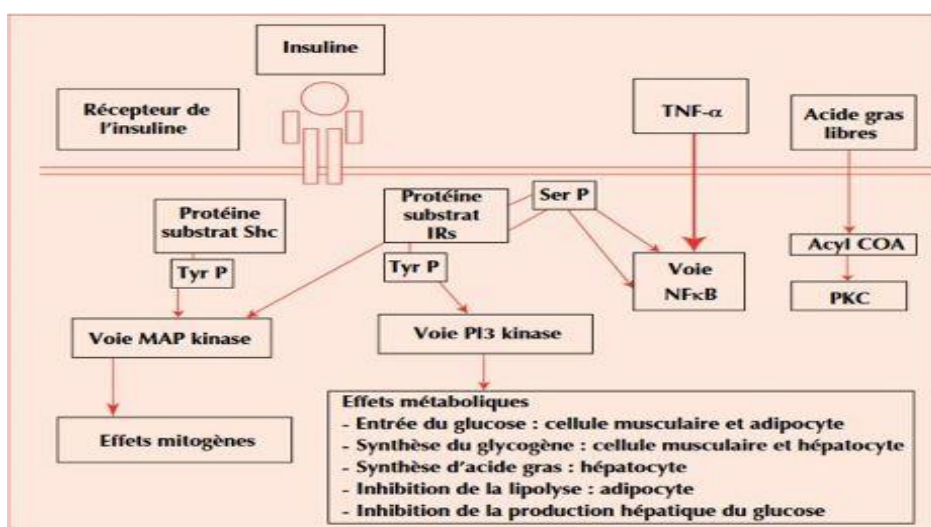


Figure 13 : Mécanismes moléculaires de la résistance à l'insuline par l'insuline elle-même.
D'après J. Capeau dans mt cardio 2006

3. Dyslipidémie et stéatose hépatique

La dyslipidémie (hyperlipidémie) et la stéatose hépatique sont deux des piliers du syndrome métabolique. Leurs actions sont fortement liées. L'obésité conduit à une augmentation de la captation des matières grasses alimentaires. Ce gras se retrouve dans la circulation sanguine et conduit à l'augmentation des TG et du cholestérol total[69]. L'organisme utilise ces matières grasses en les stockant dans les tissus adipeux sous forme de TG. Les tissus adipeux augmentent et les adipocytes sont eux même plus gros (hypertrophie) et plus nombreux (hyperplasie) que dans les tissus adipeux de personnes saines[70]. Ces augmentations diminuent [Figure 14] la production de cytokines anti-inflammatoires (adiponectine, IL-10) mais augmentent les pro-inflammatoires (TNF- α IL-6, leptine, résistine entre autres), entraînant un état inflammatoire[71]. Le tissu adipeux libère aussi des acides gras libres (FFA), provenant de l'hydrolyse des TG par une lipase. Ces FFA sont ensuite relargués dans la circulation sanguine où ils vont agir sur la lipoprotéine lipase en diminuant son action, ce qui va diminuer la clairance des TG et donc augmenter leur concentration sanguine[72]. Les FFA vont ensuite être captés par le foie (induction de la stéatose hépatique) et être retransformés en TG. Dans

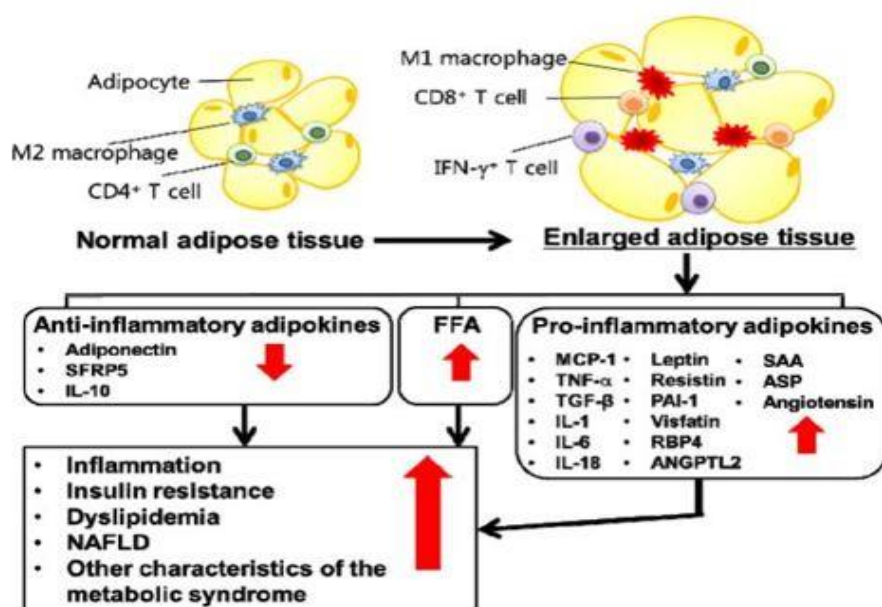


Figure 14 : Modulation de la sécrétion du tissu adipeux dans des conditions d'hyperplasie.
D'après U. J. Jung dans Int. J. Sci. 2014

le foie, l'obésité augmente la production et la sécrétion des Very Low Density Lipoprotein (VLDL) qui transportent les TG et les molécules de cholestérol estérifié. Les VLDL induisent une augmentation sanguine des LDL riches en TG dans un premier temps, puis grâce à la lipase

hépatique, les LDL vont libérer les TG dans le sang. Parallèlement, à l'augmentation des LDL, l'apolipoprotéine membranaire apoB-100 qui lui est associée augmente également. Cette protéine est un facteur de prédiction des pathologies coronariennes[73]. Inversement l'obésité conduit à la diminution des HDL, du bon cholestérol et de l'apo A-1 dans le sang [71], [74] [Figure 15]. L'absence d'apo A-1 est un signe prédictif de pathologies cardiovasculaires[75].

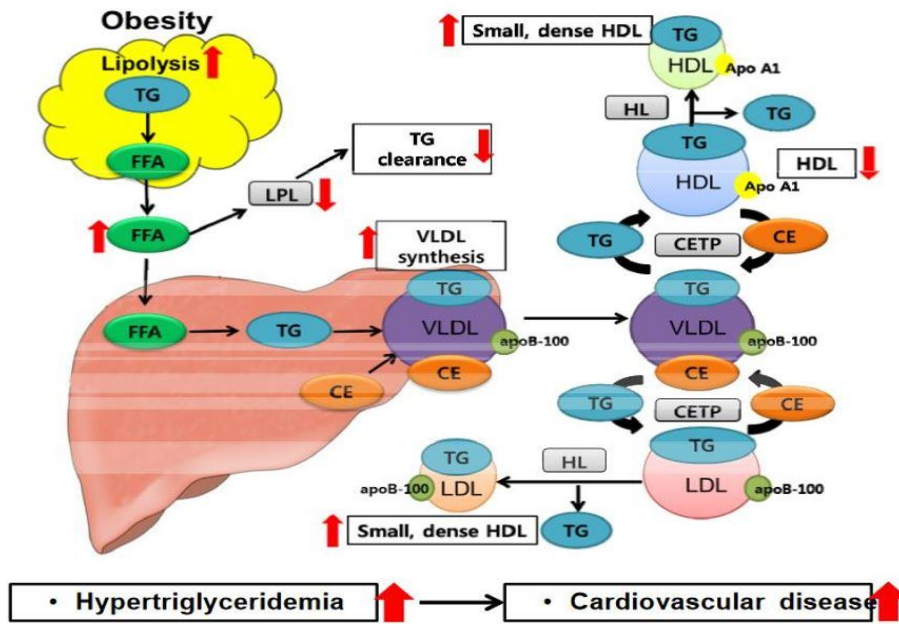


Figure 15 : Mécanisme de la mise en place de la dyslipidémie et de la stéatose hépatique chez une personne obèse. Schéma d'après U. J. Jung dans Int. J. Sci. 2014

Les FFA n'ont pas que des actions influençant le métabolisme lipidique, ils jouent aussi un rôle important dans la mise en place de la résistance à l'insuline. Lors de leur ré-estérification, les

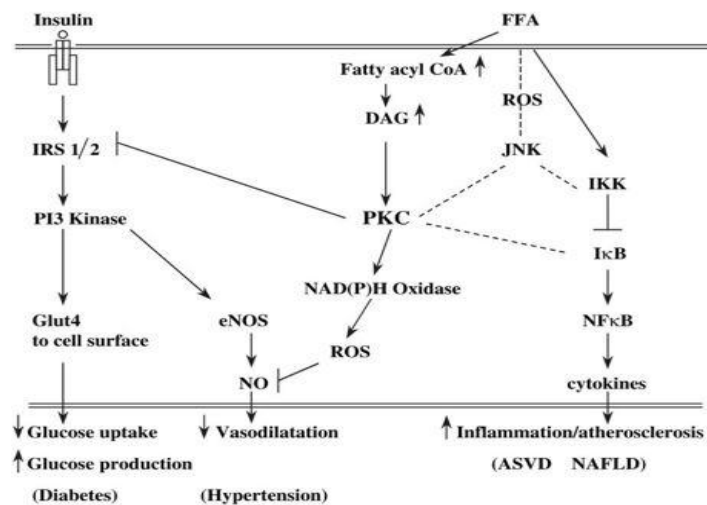


Figure 16 : Induction de la résistance à l'insuline par les acides gras libres (FFA) D'après G. Boden, Endocrinol Metab Clin North Am, 2008

FFA activent une protéine kinase C (PKC) inhibitrice de la voie d'activation de la captation du glucose par l'insuline. Les lipides par leur émissaire FFA sont donc impliqués dans la résistance au glucose. Enfin, les FFA activent aussi par les voies IKK et NF- κ B la mise en place de l'inflammation [Figure 16][72].

Le foie stéatosique peut également avoir un rôle dans la mise en place de l'inflammation. En effet, par l'activation des voies JNK/SPAK et p-38, il induit la production de TNF- α et d'IL-6[76].

La mise en place de la dyslipidémie et de la stéatose hépatique change donc du tout au tout les bases lipidiques d'une personne saine. En plus des modifications vues précédemment, il est retrouvé une diminution des acides gras insaturés (bons pour l'organisme) tels que les Omega- 3, 6 et 9 et une augmentation des acides gras saturés. Le métabolisme des lipides est augmenté et conduit à la surdose retrouvée dans le corps[77].

La description des 4 piliers du syndrome métabolique montre qu'ils sont tous interdépendant. L'apparition d'un des symptômes est, de ce fait, souvent indicatif d'un engrenage.

C. Tissus adipeux

Le tissu adipeux en général, prend de plus en plus de place dans la régulation des mécanismes énergétiques et métaboliques du corps humain. La connaissance de son rôle a beaucoup évolué depuis quelques années. Auparavant, il était considéré comme un simple tissu de stockage qui ne communiquait peu ou pas avec les autres. Maintenant, on sait qu'il n'y a pas un mais plusieurs tissus adipeux avec des propriétés et des régulations différentes, mais aussi que c'est un des principaux centres de régulation du métabolisme énergétique grâce à la sécrétion des adipokines et autres cytokines.

1. Les différents types et rôle des tissus adipeux

La communauté scientifique définit aujourd'hui 3 types de tissus adipeux, ayant chacun leur structure et leur fonction. Le plus abondant est le tissu adipeux blanc (WAT pour white adipose tissue) retrouvé classiquement au niveau sous-cutané (sWAT) et viscéral (vWAT) comprenant les zones mésentériques, péritonéales, péri-rénales et épидidymales. Structurellement, le

WAT est représenté comme étant un tissu peu vascularisé. Il est composé de grosses cellules adipocytaires avec une gouttelette lipidique unique qui remplit l'espace cellulaire. Le WAT a peu de mitochondrie. Bien que cela ne soit pas son action principale, le tissu adipeux blanc joue un rôle de protection du corps. Plus précisément, Le sWAT joue un rôle d'isolant thermique et de barrière de protection contre l'entrée de pathogène, le vWAT a lui aussi un rôle de protection des organes vitaux qu'il entoure mais aussi un rôle de réserve énergétique de proximité pour ces tissus[78]. Sa caractéristique principale est le stockage énergétique sous forme de TG. De plus, il a été montré que le WAT est associé à la résistance à l'insuline et au syndrome métabolique comme mentionnée précédemment[79], [80]. La régulation des sécrétions (adipokines et cytokines) est aussi très différente entre les conditions saines et sous obésité [81] [Figure 17]. Même si la structure du sWAT et du vWAT est identique, il est couramment admis que le vWAT a un impact plus important sur les troubles métaboliques que le sWAT[6]. Cependant, des études récentes chez l'homme et la souris tendent à prouver le contraire : le sWAT serait associé à une sévérité plus importante dans le syndrome métabolique, à une augmentation de la résistance à l'insuline et à une modification des sécrétions des adipokines (telle que l'adiponectine qui est diminuée)[82], [83]. Le sWAT serait aussi plus inflammatoire (augmentation des cytokines inflammatoire) que le vWAT et son infiltrat de macrophages serait plus élevé (plus de macrophages de type M1 que de M2)[84], [85]. Dans tous les cas, une augmentation des WAT est souvent associée à la présence de troubles biologiques importants.

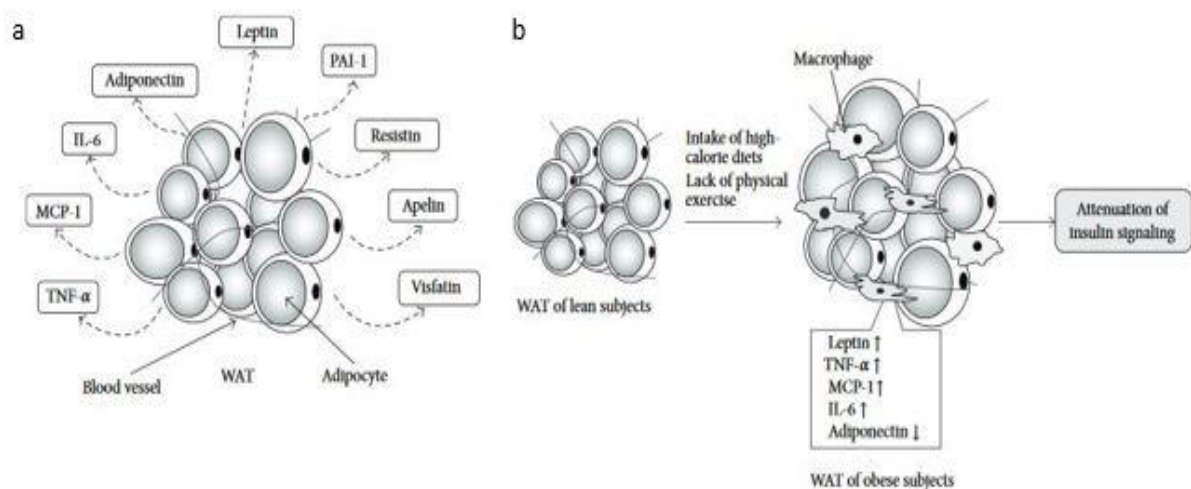


Figure 17 : Molécules sécrétées par les adipocytes

Dans des conditions normales (a) et évolution des sécrétions des adipokines en condition d'obésité (b). D'après T. Sakurai, Int. J. of Endocrinology, 2013

Il existe aussi le tissu adipeux brun (brown adipose tissue, BAT), ce tissu a d'abord été mis en évidence chez les nouveau nés en proportion importante. Chez l'adulte, la découverte de sa présence est plus récente et sa quantité est beaucoup plus faible. Il se retrouve principalement au niveau du cou, dans l'espace sous claviculaire, autour des vertèbres et du rein[86]. Le BAT est un tissu richement vascularisé et très riche en fer. Les adipocytes le composant sont des cellules riches en mitochondries et en marqueur UCP-1 (dans la membrane interne de la mitochondrie, intervient dans le mécanisme de thermogénèse). L'adipocyte brun présente de nombreuses gouttelettes lipidiques de petite taille. Le BAT est impliqué dans la production de chaleur en réponse à une baisse de la température du corps. Sa localisation lui permet de protéger les organes en conservant leur température optimale. Sa quantité est diminuée dans les conditions d'obésité, car son action est en faveur de la sensibilité à l'insuline et de la diminution de stockage énergétique.

Le troisième tissu adipeux, n'est pas réellement un tissu indépendant, mais plutôt une transformation des WAT en BAT. Ce tissu se retrouve au même endroit que les WAT et apparaît lorsque l'organisme est soumis à un stress important (baisse de la température du corps, prise de médicaments liés aux mécanismes énergétiques, mais aussi par des molécules produites par les autres organes). Il permet une adaptation à la thermogénèse lorsque le corps en a besoin. Cette adaptation se caractérise par l'augmentation du nombre de mitochondries, et de la vascularisation sous influence des facteurs dit de « browning »[87]. Ces adipocytes, dit beiges, sont morphologiquement entre les WAT et les BAT, certains présentent une seule vacuole lipidique alors que d'autres en ont de multiples. La présence d'UCP-1 est aussi augmentée, ce qui permet de différencier les adipocytes blancs des adipocytes beiges. Ces adipocytes sont encore peu connus, car récemment mis en évidence, cependant des études

ont montré l'effet inhibiteur de l'obésité sur la transformation des adipocytes blancs en adipocyte beiges favorisant ainsi le stockage à la dépense énergétique[88] [Figure 18].

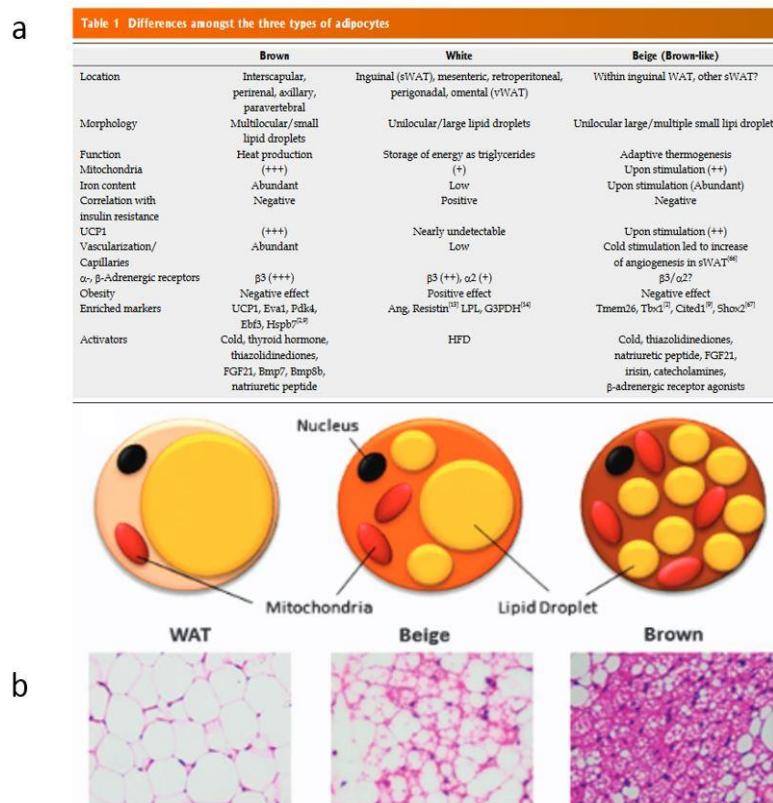


Figure 18 : Caractérisation des différents types de tissu adipeux (blanc, brun et beige).

(a) tableau récapitulatif des données principales de caractérisation (d'après Park et al 2014). (b) représentation schématique des adipocytes de chacun des tissus (d'après Kwok et al 2016)

2. Acides gras dans l'Os et les Muscles

Les acides gras sont stockés soit dans les adipocytes soit dans d'autres cellules ou tissus tels que les os ou les muscles, sous forme de gouttelettes lipidiques, qui peuvent être utilisées par les cellules comme lieu de stockage. Les adipocytes isolés (hors du tissu adipeux) ont des actions qui restent proches de ceux du tissu adipeux de référence. La majorité de ces adipocytes sont des adipocytes de type WAT. Leur présence en quantité physiologique dans les tissus autres qu'adipeux est d'ailleurs naturelle. Leur nombre peut varier lors de pathologies. Chez les obèses, leur nombre augmente fortement et provoque de nombreux troubles physiologiques dans l'organe associé, mais aussi sur le reste de l'organisme.

Dans le muscle, les acides gras sont stockés dans les IMAT (intermuscular adipose tissue) situés entre les fibres musculaires dans le péri-mysium ou l'épi-mysium, ou les IMCL (intramyocellular lipids) situés dans les myocytes[89] [Figure 19]. Dans des conditions physiologiques, les IMAT

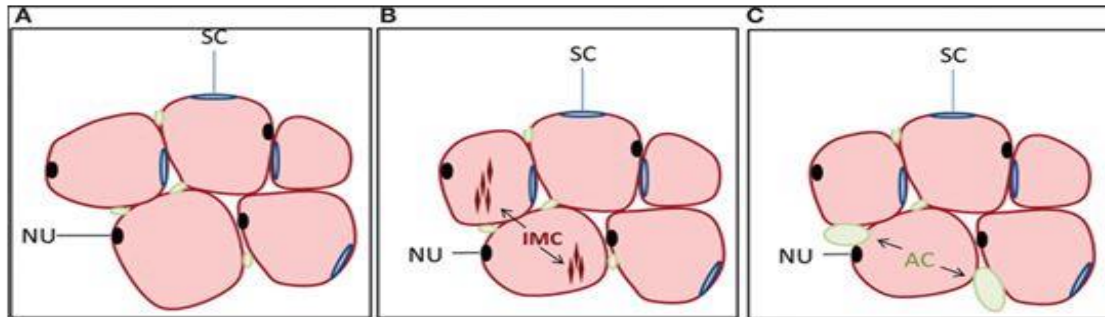


Figure 19 : Schéma représentant les différents types d'infiltrations graisseuses dans le muscle.

(a) muscle en condition normale. (b) présence de gouttelettes dans les cellules (IMC). (c) présence d'adipocytes entre les cellules musculaires (AC). SC (satellite cells), NU (nucleus), IMC (intramyocellular lipids), AC (adipocyte cells). D'après Hamrick et al 2016

semblent jouer un rôle bénéfique dans la structuration et la régénération des muscles après une lésion[90], [91]. En revanche, les IMCL ou gouttelettes lipidiques de TG, sont très peu présents chez des sujets sains, car le muscle les utilise directement[92]. Une augmentation des IMAT et IMCL peut être une conséquence physiologique liée à l'âge par exemple, mais c'est aussi un signe de désordre physiologique lors de l'obésité. Il y a une corrélation entre la quantité d'IMAT et IMCL et la prise de poids. L'augmentation des IMAT dans le muscle conduit à des dysfonctionnements musculaires et augmente et le risque de fracture[93]. En effet, les IMAT comme le WAT jouent un rôle dans la sécrétion d'adipokines et l'activation des macrophages, créant un environnement délétère pour les muscles[94]. En revanche les IMCL semblent être plus en lien avec la résistance du muscle à l'insuline et le syndrome métabolique systémique[95], [96]. En effet, la quantité de FFA entrant dans la cellule est supérieure à celle utilisée par les mitochondries, la cellule doit donc stocker les FFA sous forme de gouttelettes de TG. Durant le processus de transformation des FFA en TG de nombreux composés tels que le diacyl-glycerol (DAG) ou l'acide lysophosphatidique (LPA) sont transitoirement formés. Ils inhibent les serines kinases (IKK, JNK, mTOR) et donc conduisent à la résistance à l'insuline[97] [Figure 20]. Si on réactive la lipolyse et la lipophagie dans les cellules musculaires, on diminue

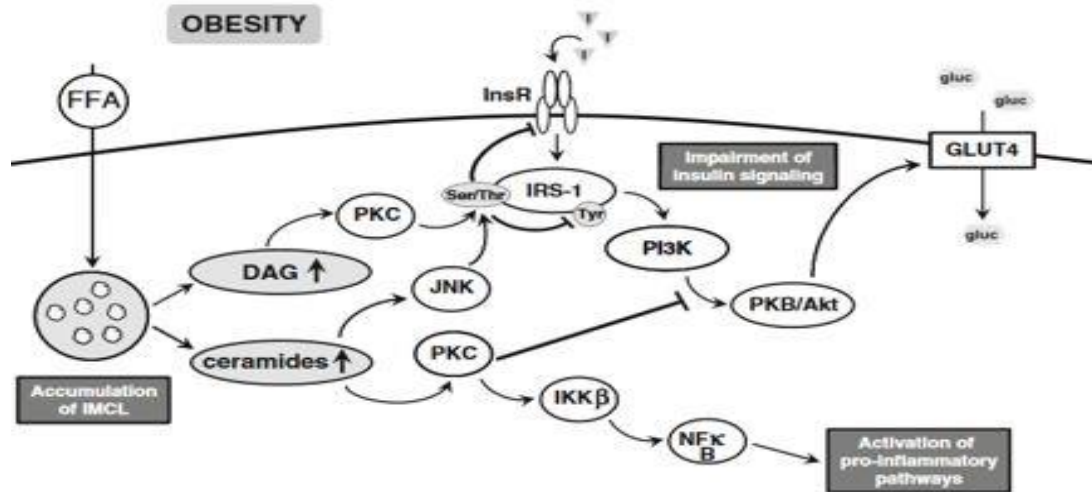


Figure 20 : Modélisation de l'induction de la résistance à l'insuline par les FFA, voie de signalisation mise en place pour inhiber la voie des transporteurs GLUT4.
D'après Eckardt et al 2011.

dans un premier temps les IMCL, puis on ré-augmente la β oxydation des mitochondries et donc la survie des myocytes[98]. En plus, d'influencer le métabolisme énergétique des fibres musculaires, l'accumulation d'IMCL et d'IMAT conduit à des troubles dans la contraction des myocytes et favorise l'atrophie des fibres musculaires de types I et IIb[99], [100]. L'activité physique semble être une contremesure à l'installation et au maintien des IMAT et IMCL dans le muscle.

La présence d'adipocytes est également mise en évidence dans la moelle osseuse. Ils représentent un tissu particulier, le marrow adipose tissue (MAT). Ce tissu est principalement retrouvé dans la moelle osseuse d'os longs comme le fémur et le tibia. Dans la littérature, deux types de MAT ont été décrits pour la 1^{ère} fois par Tavassoli[101], les cMAT (pour constitutive MAT) dans des régions distales du squelette (ou moelle jaune). Ils ont la capacité de s'accumuler en continu tout le long de la vie[102]. Ils sont regroupés en larges adipocytes agglutinés les uns aux autres. Ils contiennent principalement des lipides insaturés. Ces cMAT secrètent de nombreuses adipokines stimulatrice de la sensibilité à l'insuline et inhibitrices des effets stéatosiques[103], [104]. L'autre type de MAT est le rMAT (pour regulated MAT), composé d'adipocytes de plus petite taille, isolés les uns des autres [Figure 21] au sein de la moelle rouge surtout au niveau du squelette proximal. Leur apparition est plus tardive que celle des cMAT et dépend de l'âge et des conditions physiopathologiques (comme l'obésité). Les rMAT sont riches en lipides saturés et ont une fonction proche du WAT, ils ont donc un

rôle plutôt négatif sur la structure osseuse[105]. L'augmentation des rMAT et la diminution de la formation osseuse sont souvent directement liées. En effet, les cellules pro-génitrices des ostéoblastes, chondrocytes et adipocytes proviennent des mêmes cellules souches. L'environnement influence donc la voie de différenciation[106] et donc l'apparition des rMAT. Dans les cas d'obésité, les rMAT sont augmentés, alors que les cMAT ne sont pas modifiés. Le ratio cMAT/rMAT est donc en faveur des cMAT chez des individus sains et des rMAT dans l'obésité.

Le tissu adipeux, les adipocytes et les gouttelettes lipidiques ont donc une fonction importante dans la régulation du métabolisme énergétique et musculo-squelettique.

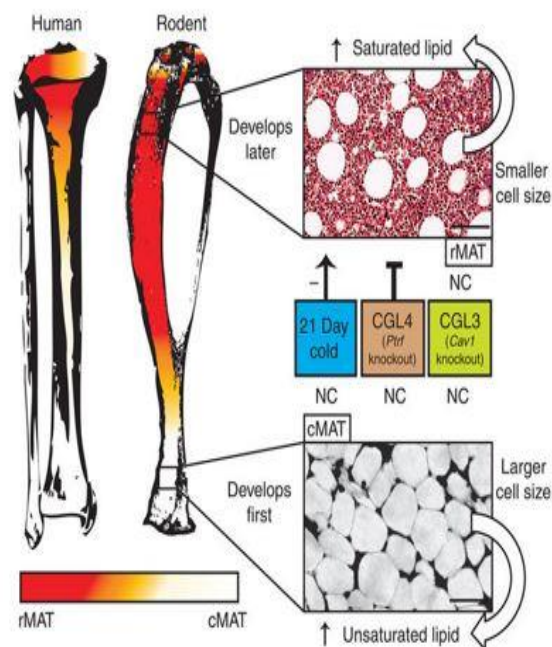


Figure 21 : Représentation des caractéristiques des rMAT et cMAT dans les os humain et murin. D'après Scheller et al Nature 2015

IV. Triade Os-Muscle-Tissu Adipeux

La relation os-muscle-tissu adipeux est naturellement importante dans le corps humain. Durant la croissance, le tissu musculaire a un développement plus rapide que le tissu osseux[107]. De ce fait, il intervient dans l'acquisition du capital osseux. Inversement, l'os via les attaches musculaires contribue au fonctionnement musculaire. Il est donc nécessaire que l'un et l'autre puissent dialoguer. De plus, des myoblastes ont la capacité de se redifférencier en ostéoblastes lors d'ossification ectopique dans le muscle dans certaines pathologies[108] ce qui montre le lien entre les deux lignages cellulaires. Les adaptations osseuses et musculaires varient souvent de façon identique, un gain musculaire favorise un gain osseux. Il y a une forte communication entre os et muscle grâce à des molécules sécrétées aussi bien par le muscle[108], [109] que par l'os[110], [111]. Ces cytokines telles que l'IL-15 et l'ostéocalcine (OCN) peuvent avoir des rôles activateurs de la formation et sensibilisation osseuses et musculaires. D'autres sont inhibitrices, comme la myostatine qui diminue la formation osseuse et musculaire. Ces deux tissus sont aussi régulés par le tissu adipeux. Aussi bien dans l'os que dans le muscle, les cellules-souches peuvent se différencier en adipocytes. Dans l'os et le muscle, le dialogue avec le tissu adipeux est primordial afin de maintenir et l'homéostasie du métabolisme énergétique.

Dans la communication os-muscle-tissu adipeux, il est possible de distinguer deux types de couplage. Un dit « mécanique » qui regroupe, toutes les interactions physiques entre les différents tissus et un couplage « métabolique » qui correspond à la communication et aux échanges moléculaires entre ces tissus. Les effets mécaniques engendrent eux-mêmes des réponses biologiques.

A. Couplage mécanique et effet de l'hypergravité

Dès les années 60, le couplage os-muscle est considéré par Harold Frost et sa théorie du mécanostat[112]. Le mécanostat décrit quantitativement les forces appliquées à l'os par le muscle pour contrôler sa régulation (formation et résorption). Schématiquement Frost distingue 3 cas de figure. Une sous-stimulation du muscle sur l'os qui entraîne une perte

osseuse (augmentation de l'activité des ostéoclastes et diminution de celle ostéoblastes). A contrario, une sur-stimulation de l'os conduit à une formation rapide d'os nouveau de type cal osseux et/ou à des fractures de fatigue. La sur et sous-stimulation ne sont donc pas ce qu'il y a de mieux pour le système musculo-squelettique[113]. Le troisième cas est un état intermédiaire compris entre une sur et une sous-stimulation où [Figure 22] les forces musculaires appliquées sur l'os modulent sa géométrie par optimisation du remodelage osseux.

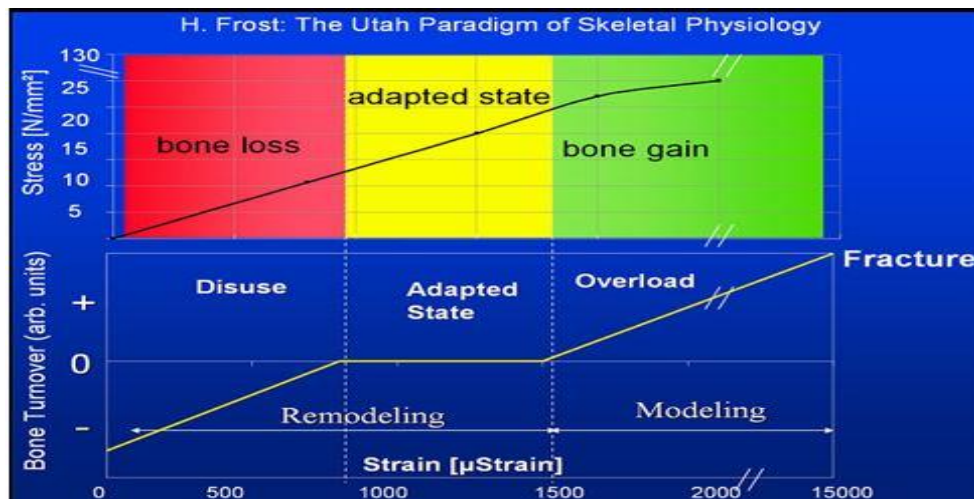


Figure 22 : Mécanostat de Frost (1987) : Evolution du renouvellement du tissu osseux dans différentes conditions de contraintes mécaniques.

Inversement, la rigidité de l'os contraint mécaniquement le muscle en stimulant ou inhibant la production de myocytes selon si les forces sont importantes ou pas[114].

Il est difficile d'isoler les seuls effets du couplage mécanique de ceux du couplage métabolique. Dans notre travail nous utilisons l'hypergravité pour mimer le surpoids acquis lors de l'obésité et donc l'augmentation des forces appliquées sur les structures musculo-squelettiques sans les troubles métaboliques (diabète etc...) souvent associés.

L'hypergravité en tant que modélisation de la surcharge mécanique de l'obésité est, à notre connaissance, un modèle original. Les effets d'une exposition à l'hypergravité dans des modèles murins non obèses ont été cependant déjà explorés. L'intensité de la gravité joue un rôle important dans la réponse des tissus de soutien et notre laboratoire a montré que les effets ne sont pas linéaires. En effet une exposition de 21 jours à 3g a des effets négatifs sur le développement osseux en diminuant l'épaisseur corticale et en stimulant la résorption osseuse [115]. En revanche une exposition à 2g, chez des rats ou souris C57BL6/J entraîne des effets bénéfiques avec gain osseux (augmentation du volume trabéculaire et de l'épaisseur

des travées osseuses[116], [117]) et diminution de la résorption osseuse chez des souris C57BL6/J. Toutefois plusieurs études chez des rats [115], ou des souris [113] montrent une diminution de l'épaisseur corticale à 2g, mais avec une durée d'exposition de 90 jours. Dans d'autres études *in vitro* plus focalisées sur les modifications des cellules osseuses dans des conditions d'hypergravité extrême (5g), une prolifération des cellules ostéoblastiques et une différenciation diminuée sont rapportées[118]. Si certains observent une activité de résorption osseuse diminuée chez des souris[115], d'autres mettent en évidence un effet inverse chez des rats[119]. L'hétérogénéité des résultats suggère que la durée d'exposition à l'hypergravité, l'âge des animaux, l'espèce considérée ainsi que l'environnement d'étude (temps d'accélération et de décélération, nombre d'arrêt et de reprise de l'hypergravité) influence les résultats. Plus le squelette est jeune plus l'impact bénéfique ou négatif est visible. Durant cette phase de croissance, l'os est fortement actif et les modulations sont constantes, l'effet de l'environnement est donc plus important. Les effets de l'hypergravité ne sont pas linéaires et peuvent être représentés par une courbe en cloche avec un effet bénéfique entre 0 et 2g et des effets plutôt délétères au-dessus de 3g[35], [115].

Le surpoids généré par hypergravité conduit aussi à des modifications au sein du tissu musculaire. Les conséquences musculaires diffèrent en fonction du site et de la force gravitationnelle. Par exemple, à 2g et durant 14 jours, le tibialis antérieur est diminué alors que le muscle soléaire est augmenté[120]. Dans les mêmes conditions le muscle gastrocnémien présente une perte de contractilité[121]. Dans une autre étude, 30 jours d'hypergravité à 2g n'ont pas généré de modification dans la masse musculaire, mais une répartition différente des types de fibres. Ainsi une augmentation des fibres oxydatives de type I et une diminution des fibres glycolytiques de type II ont été rapportées dans le muscle soléaire[122]. Une exposition de 4 semaines à 3g induit une diminution de la masse musculaire globale. Dans le muscle soléaire de souris, l'hypergravité à 3g augmente l'aire des fibres musculaires sans changement de la typologie[123]. Au-dessus de 4g, les effets sont extrêmement délétères[124]. Au global, il apparaît que l'hypergravité agit selon le tissu et le site étudié et aussi selon l'espèce animale. Chez les souris, une hypergravité de 2g a des effets plutôt positifs alors qu'à partir de 3g les effets sont globalement négatifs. De plus la durée d'exposition à l'hypergravité est un facteur déterminant sur les tissus musculo-squelettiques. Un bon compromis semble être une durée importante (supérieure à 4 semaines mais

inférieure à 12 semaines) et une intensité modérée ($\leq 2g$) pour obtenir des effets durables et bénéfiques sur l'appareil locomoteur.

Notons que dans la littérature, il n'existe pas d'étude sur le rôle du tissu adipeux en lien avec les tissus musculaires et osseux dans des modèles d'hypergravité.

B. Couplage Métabolique

Le couplage métabolique entre ces 3 tissus se fait par des hormones produites par des cellules spécialisées (cellules B pancréatiques par ex) qui ont une action endocrine ou paracrine, ou par des cytokines, petites protéines (5 à 20 kDa) synthétisées par la plupart des cellules. Ces dernières sont souvent regroupées sous le nom de l'organe qui les produit tel que les adipokines (tissu adipeux), myokines (muscles) et ostéokines (Os). Les cytokines ont des actions paracrines, endocrines comme les hormones, mais leur spectre d'action est plus large et plus vaste que les hormones.

Nous ne développerons que les principaux acteurs métaboliques qui ont une influence reconnue dans nos tissus d'intérêt.

1. L'insuline et l'IGF1

L'insuline est l'une des actrices principales du métabolisme énergétique. Elle est sécrétée par les cellules β des îlots de Langerhans et possède une action systémique par la circulation sanguine. Son action première est de favoriser la captation du glucose. La fixation de l'insuline sur son récepteur influence de nombreuses voies dont celles impliquées dans le remodelage osseux. Dans l'obésité, la résistance à l'insuline conduit à une diminution de la résorption osseuse[125], [126]. En effet, dans un état sain, l'insuline se fixe sur son récepteur au niveau des cellules ostéoblastiques, cela augmente leur différenciation par l'activation de la voie Runx2 et l'inhibition de la production de l'ostéoprotégérine (OPG), un inhibiteur de la différenciation ostéoclastique. L'insuline va donc augmenter la formation (par activation des ostéoblastes) et la résorption (par l'inhibition d'OPG favorisant par ce fait, l'action de RANKL sur RANK et la différenciation des pré-ostéoclastes en ostéoclastes). L'insuline agit donc

positivement sur l'ostéogénèse [127] [Figure 23]. L'insuline par le biais de l'activation des ostéoclastes conduit à l'augmentation de la libération de l'ostéocalcine active, forme décarboxylée (ucOCN) dans la circulation. Celle-ci agit sur les ilots β pour stimuler la production d'insuline.

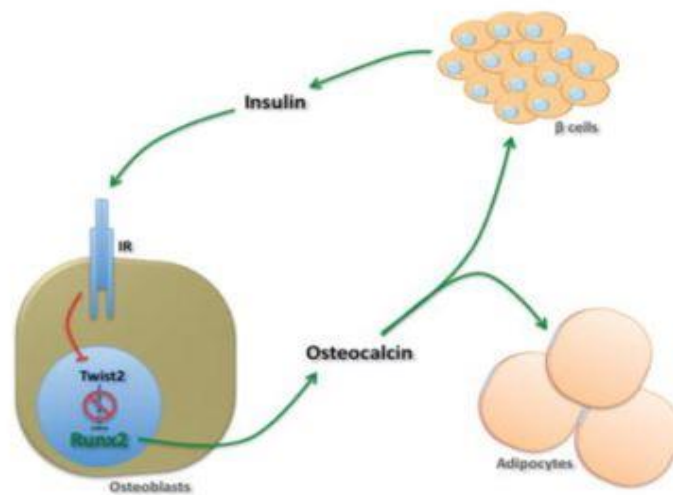


Figure 23 : Modèle de régulation de l'insuline sur les ostéoblastes par induction de l'ostéocalcine. D'après Fulzele et al 2011

Au niveau musculaire, l'insuline a une action dans la captation du glucose. En effet, le muscle est le principal consommateur de glucose avec le cerveau. La fixation de l'insuline sur son récepteur active la voie IRS1/2-PI3K qui permet la translocation membranaire des transporteurs GLUT4 (transporteur de glucose membranaire)[128]. L'insuline active aussi la voie SOS-ERK1/2 et la production de FoxO dans le muscle. La protéine va agir à distance sur la production de glucose par les cellules hépatiques[129]. L'action de l'insuline dans le muscle est principalement d'activer les voies de régulation de l'homéostasie des sucres [Figure 24].

L'action de l'insuline sur le tissu adipeux est similaire à celle sur le muscle, elle va permettre la captation du glucose. Cependant au lieu d'être consommé comme dans le tissu musculaire,

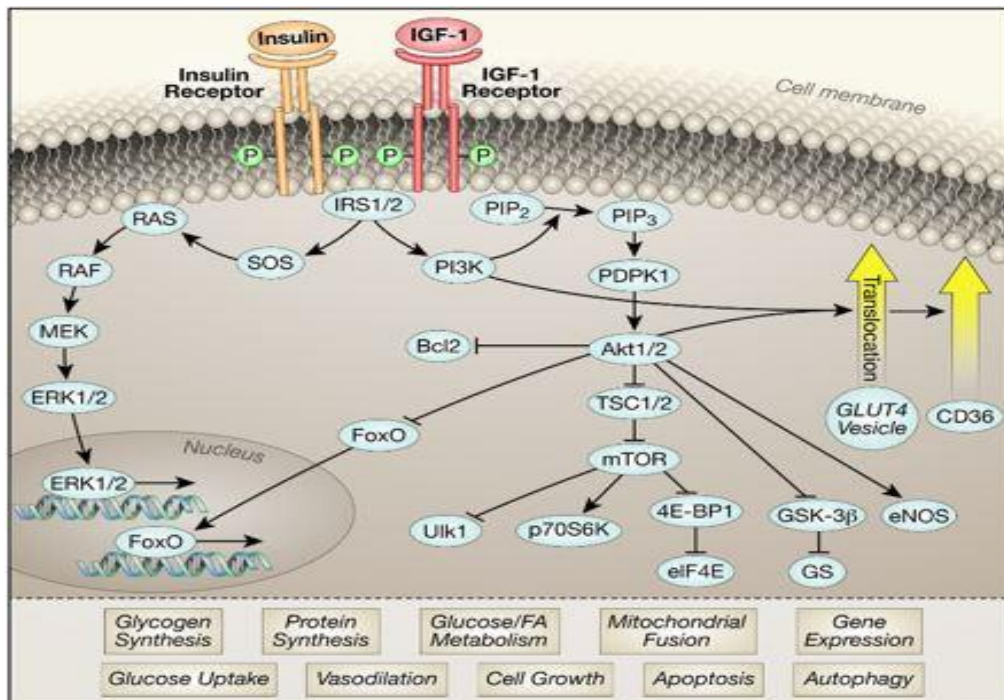


Figure 24 : Schématisation de la voie de l'insuline et de l'IGF-1 pour augmenter la quantité de transporteur de glucose (GLUT4) et d'acide gras (CD36) à la membrane. D'après Riehle et al 2016.

il est transformé et stocké sous forme de TG. Ceux-ci seront, par la suite, utilisés quand l'organisme aura besoin d'énergie[130].

Dans les cas d'obésité et de résistance à l'insuline, ces voies de signalisation sont perturbées car l'insuline ou ses récepteurs ne fonctionnent pas correctement (diminution de leur quantité membranaire et donc du signal). Dans l'os, l'obésité favorise le lignage adipocytaire au dépend du lignage ostéoblastique [131]. La formation osseuse est ainsi diminuée et la fragilité osseuse s'installe. Dans le muscle, l'obésité et la résistance à l'insuline réduisent les mécanismes nécessitant le glucose telles que les fonctions mitochondriales. Mais cela active aussi la voie des caspases 3 et 9 et l'apoptose[132], conduisant à la perte de masse musculaire par mort cellulaire. Dans le tissu adipeux, en condition d'obésité, l'insuline n'agit plus de façon physiologique favorisant le stockage (volume des TA fortement augmenté) et la lipolyse des TG en FFA [Figure 25].

Les actions de l'IGF-1 (Insulin Growth-Factor 1) sont proches des actions de l'insuline. Dans l'os, IGF-1 peut se fixer sur ses récepteurs (IGF-1R IGF-2R ou le récepteur à l'insuline IR) et active mTOR et ERK, voies de régulation positive de la transcription des gènes impliqués dans la croissance et la prolifération[133]. Dans le muscle, IGF-1 à un rôle fondamental dans les

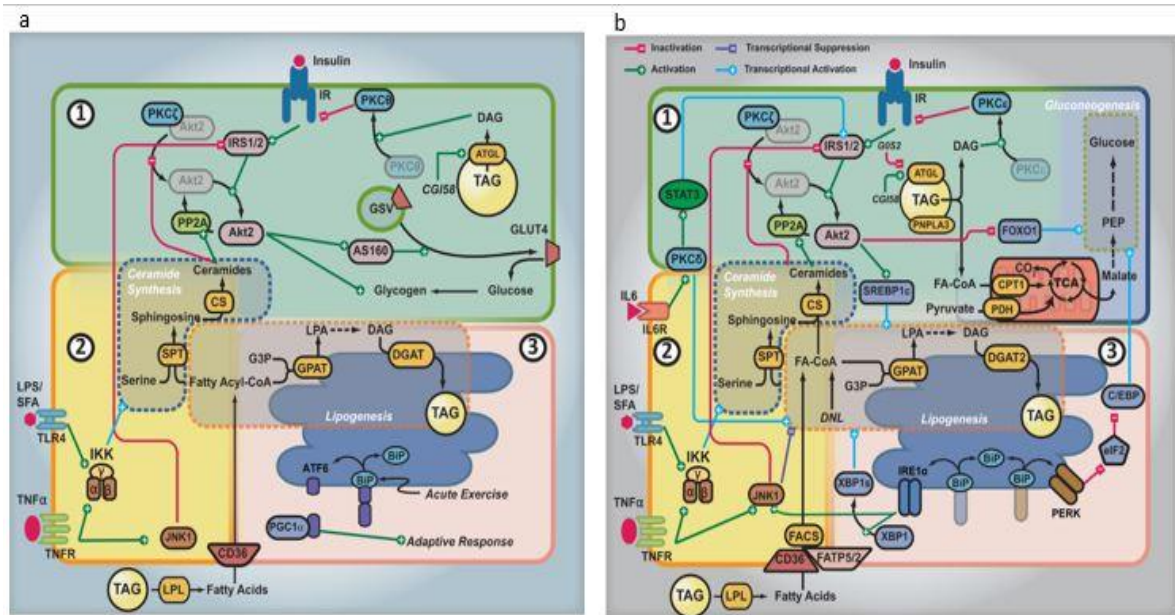


Figure 25 : Représentation schématique des voies d'induction de la résistance à l'insuline.

a) dans le muscle (b) dans le foie. La zone en vert désigne les mécanismes impliquant les lipides et les glucides, la zone en jaune représente les mécanismes inflammatoires et la zone en rouge représente la lipogenèse, dans la résistance à l'insuline. D'après Samuel et al 2012

voies de synthèse des protéines musculaires[134], [135]. IGF-1 intervient sur mTOR et Akt qui sont des composants des voies d'hypertrophie musculaire. La fixation de l'IGF-1 sur ses récepteurs déclenche une cascade de signalisation conduisant à l'inhibition de la caspase 3[136]. Cependant, l'IGF-1 est aussi une molécule de communication entre le muscle et l'os permettant aux deux tissus d'évoluer dans le même sens. Son action sur le tissu adipeux est encore peu connue. Dans les cas d'obésité, les voies de signalisation de l'IGF-1 sont diminuées et donc cela favorise la résorption osseuse (par diminution de la formation) et la perte de masse musculaire (apoptose des myocytes par la voie caspase 3).

2. La Leptine

C'est une l'hormone majeure de la satiété, avec la ghréline. La leptine agit de deux façons opposées, soit par action locale, soit via le système nerveux central qui agit à son tour sur les organes cibles. L'action locale se fait lorsque son taux sanguin augmente de façon transitoire alors que l'activation de la boucle centrale se fait lorsque la concentration sanguine augmente durablement. La leptine a une action directe sur la différenciation des cellules-souches de la moelle osseuse vers la voie ostéoblastique plutôt que la voie adipocytaire. Les ostéoblastes nouvellement formés augmentent la production d'OPG, qui va diminuer la différenciation

ostéoclastique. La leptine par action directe joue donc un rôle stimulateur dans la formation osseuse sans activer la résorption[137] [Figure 26]. A l’opposé, l’action de la leptine sur la sérotonine et sur le neuropeptide CART (cocaine amphetamine related transcript) au niveau du SNC induit des effets inhibiteurs de la formation osseuse (activation du récepteur β adrénergique et de la voie CREB, c-myc et de la cycline D) par diminution de la prolifération

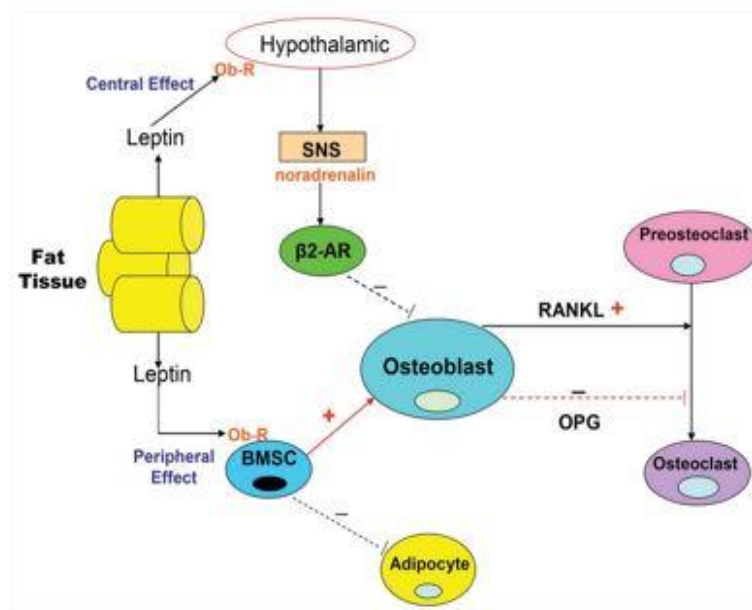


Figure 26 : Schéma de l’action de la leptine (voie directe et indirecte) sur les cellules osseuses. D’après Tian et al 2015.

des cellules ostéoblastiques. De plus dans l’ostéoblaste, le système nerveux sympathique par le récepteur $\text{Adr}\beta 2$ augmente ATF4, celui-ci conduit à la diminution la production de RANKL et donc la résorption [138] [Figure 27]. L’élévation de ATF-4 fait augmenter les protéines Esp et OCN, cela entraîne l’inhibition de la Glu-OCN et donc diminue la tolérance au glucose et la sensibilité à l’insuline[138]. Dans les cas d’obésité, les taux de leptine sont augmentés de façon importante et durable, activant ainsi la voie centrale. Il y a donc une diminution des ostéoblastes et une augmentation des ostéoclastes conduisant à une perte osseuse[34], [139].

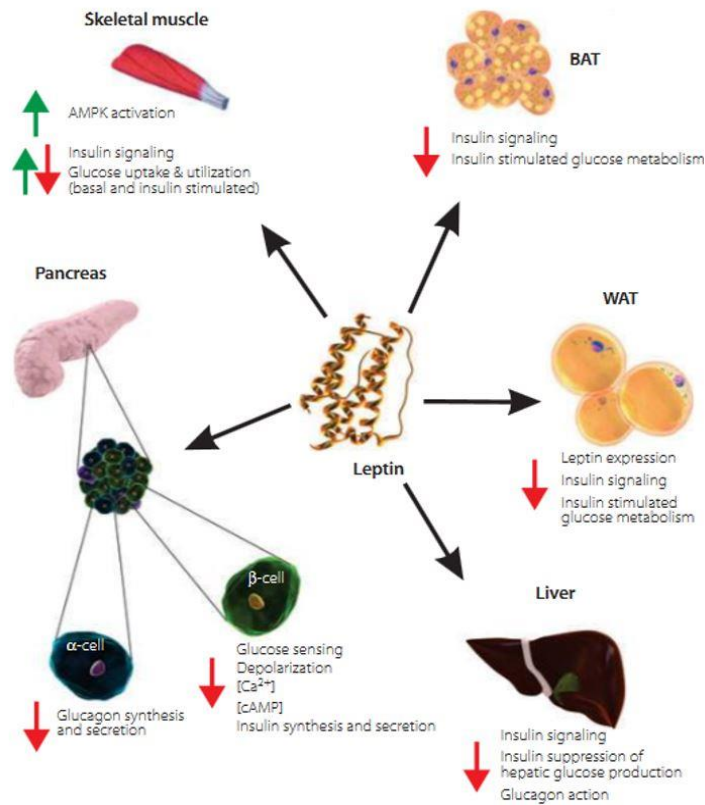


Figure 27: Schématisation de l'action directe de la leptine sur les tissus ainsi que les effets obtenus. D'après Denroche et al 2012.

Les effets directs de la leptine sur le muscle se font après la liaison sur le récepteur Ob-R et l'activation des voies de signalisation JAKs–STAT mais aussi AMPK. Ces voies sont associées à la production de protéines et à la croissance musculaire. La leptine joue aussi un rôle dans la régulation de l'insuline et la captation du glucose en favorisant son utilisation par les cellules musculaires[135], [140] [Figure 28]. Les effets centraux via le SNC sont aussi bénéfiques que les effets directs au niveau musculaire, en conduisant à l'augmentation de la captation du glucose et la sensibilité à l'insuline[140]. Dans les cas d'obésité, le tissu adipeux est augmenté ce qui

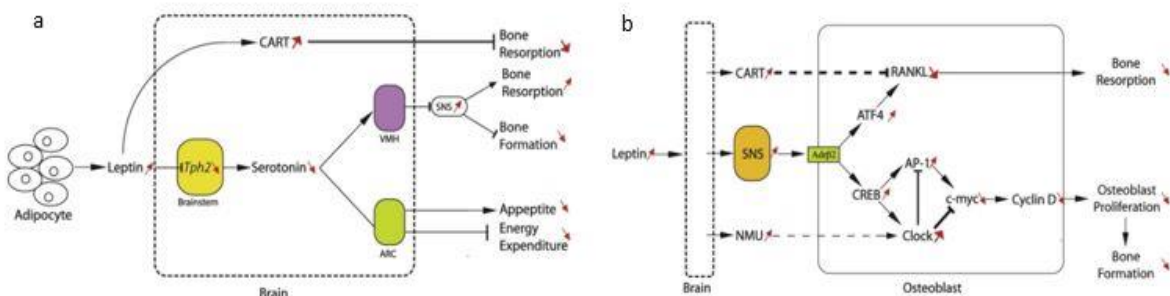


Figure 28 : Mécanisme d'action par le SNC de la leptine. (a) au niveau des cellules cérébrales et (b) sur les ostéoblastes D'après Wei et al 2010.

fait que la production de la leptine l'est aussi, une trop grande concentration en leptine conduit à une résistance au niveau des cellules musculaires par une sur-stimulation des récepteurs et une diminution de leur présence à la membrane. L'absence de signalisation entraîne des effets dramatiques pour la survie des myocytes et des muscles en général[141].

La leptine a aussi une action sur le tissu adipeux. Elle va par une action locale ou par via le SNC, inhiber les signaux de l'insuline et du métabolisme du glucose dans des conditions d'obésité. Elle va aussi stimuler la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (IL-6 TNF- α) par les monocytes du TA[140], [142].

En plus du rôle de ces 3 hormones sur les tissus osseux, musculaires et adipeux, chacun de ces tissus sécrète ses propres cytokines qui, elles aussi, interagissent.

3. Cytokines

a) Myokines

Une des myokines les plus connue est la myostatine (ou GDF8), elle fait partie de la superfamille des ligands BMP/TGF β comme l'activine A et GDF-11. La myostatine se fixe sur des récepteurs activines (surtout type IIA and IIB) pour activer ces voies de signalisation sur les cellules cibles. Son rôle de régulateur négatif de la croissance et de la régénération musculaires ainsi que la régulation des adipocytes blanc et brun est bien connu[143]–[145]. Son rôle sur le tissu osseux reste cependant partiellement connu[146]. Chez différentes espèces (souris, chien, bovins, ovin, mais rarement chez l'humain) n'exprimant pas la myostatine, une augmentation des masses musculaires, peu de TA et une masse osseuse augmentée sont rapportées[147]. Les études associent souvent à la myostatine son antagoniste la follistatine. Cette protéine fait elle aussi partie de la famille des TGF- β . Elle agit en se fixant sur la myostatine empêchant ainsi la liaison molécule récepteur[148]. La follistatine peut aussi se fixer sur le récepteur activine RIIB (Act RIIB) et inhiber les voies liées au récepteur autre que la myostatine[149]. Elle est également impliquée dans la régulation osseuse et musculaire[150], [151].

Au niveau osseux, la déficience en myostatine augmente la formation osseuse, surtout via la surcharge mécanique que les masses musculaires appliquent à l'os. De plus la myostatine a une action directe sur les ostéoclastes par l'augmentation de l'expression de NFATC1, par action sur son facteur de transcription SMAD2[152], [153]. Ceci va réduire la résorption osseuse. Cette réduction, par le maintien du couplage diminue l'activité de formation osseuse [154]. L'inhibition de la myostatine ou de cette voie réduit la résorption osseuse. Chez des personnes saines, une inhibition pharmacologique de la myostatine augmente le remodelage et la masse osseuses[155]. De plus, il y a une corrélation négative entre DMO et myostatine[156]. Ce lien est une des explications de la perte osseuse lors de l'obésité[157]. Dans les cas d'obésité, la concentration de myostatine est augmentée dans la circulation. Chez des rats soumis à un régime HFD, l'inhibition par injection d'anticorps contre la myostatine entraîne un arrêt de la perte osseuse trabéculaire[158]. Chez la souris, cette inhibition diminue la différenciation des ostéoclastes[152]. Les effets d'une inhibition par l'utilisation d'anticorps ou d'une délétion génique sur la myostatine sont différents. Une délétion génique est associée à une augmentation de l'épaisseur corticale[158] alors qu'avec une inhibition par anticorps agit positivement sur la microarchitecture de l'os trabéculaire mais ne modifie pas l'os corticale. De plus, en inhibant la liaison molécule/récepteur, il a été montré une diminution de l'effet de la myostatine, conduisant à une augmentation de la formation osseuse[146].

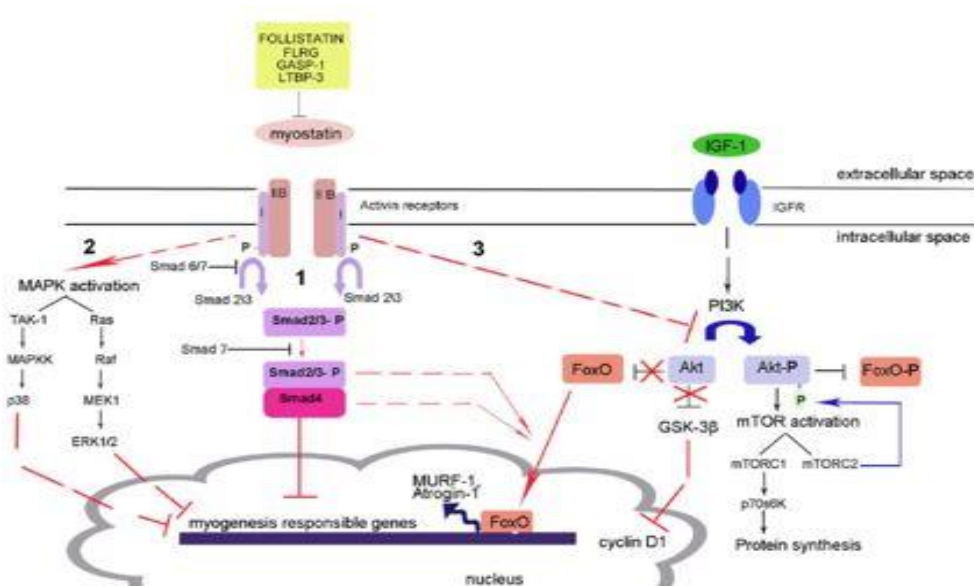


Figure 29 : Voies d'activations et d'inhibitions de la myostatine sur les cellules musculaires. D'après Elkina et al 2011

La myostatine joue donc un rôle clef en limitant le développement musculaire. Sa production est activée par une stimulation insuffisante des muscles[159] ou suite à des troubles pathologiques (alitement prolongé[160], fracture, maladies cardiaques ou rénales[161]). Son mode d'action passe essentiellement par sa liaison au récepteur l'ActRIIb qui va activer les voies Smad2/3 et Smad 4. En parallèle, les voies PI3K Akt et mTOR sont inhibées, ce qui induit une atrophie musculaire et un catabolisme protéique[162] [Figure 29]. Chez l'humain sain, les taux de myostatine dans le muscle et le sang sont très faibles, mais ils augmentent chez le sujet obèse avec une corrélation entre sévérité de l'obésité et taux de sécrétion de la myostatine[163]. Les taux importants de la protéine activent les voies décrites auparavant et conduisent à une perte musculaire importante[164] [Figure 30].

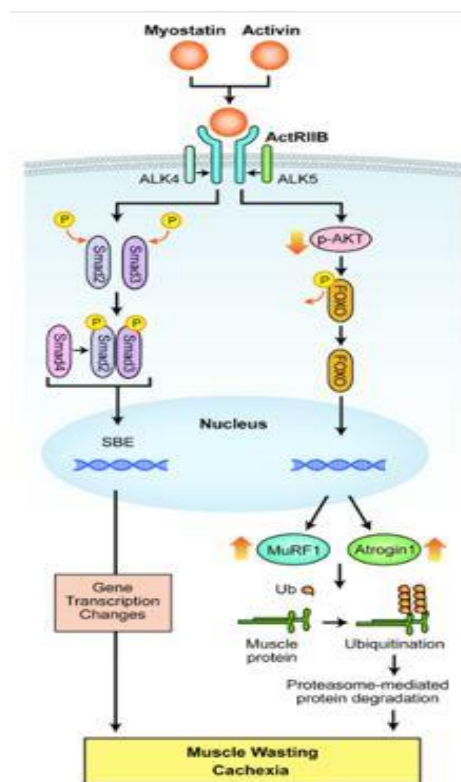


Figure 30 : Modélisation de la cascade d'activation de la myostatine par son récepteur ActRIIB sur la perte musculaire.
D'après Han et al 2011.

Dans l'obésité, la myostatine est aussi augmentée dans les tissus adipeux[165], [166]. Des souris myostatine -/- présentent non seulement moins de gras mais aussi une augmentation de la sensibilité à l'insuline[167], [168]. Au contraire, une surexpression de la protéine génère une hypertrophie du tissu adipeux. Les adipocytes possèdent les récepteurs de cette molécule[156]. Il semblerait que l'effet de la myostatine ne soit pas un effet direct, l'inhibition

de la myostatine conduit à une augmentation de la masse musculaire et donc à une demande énergétique importante. Cette énergie est produite grâce aux lipides stockés dans le tissu adipeux. L'inhibition de la myostatine améliore le métabolisme énergétique et contribue à la diminution du TA[157]. Ces données font de la myostatine une molécule importante dans la régulation musculo-squelettique en général et particulièrement dans l'obésité.

L'irisine est une myokine nouvellement découverte, sécrétée majoritairement par le tissu musculaire. L'irisine est la forme soluble du fragment extracellulaire du peptide membranaire FNDC5. Dans le muscle, elle régule les dépenses et le métabolisme énergétiques[169]. L'irisine et la myostatine agissent de façon antagoniste, car une inhibition de la myostatine conduit à une augmentation de la production et de la sécrétion d'irisine par le muscle[170]. Sa production se fait majoritairement lors de l'exercice physique ou par des stimulations musculaires grâce à l'activation des voies impliquant PGC-1 α et ERK. La production d'irisine va activer la voie p38 MAPK-GLUT permettant le transport et la captation du glucose par les cellules musculaires[147]. L'irisine intervient aussi dans la croissance et le développement musculaire.

Lors de sa découverte, elle fut un moment, décrite comme le remède moléculaire contre l'obésité[171], avant d'être décriée à cause de problèmes de dosage qui ne permettaient pas de la mettre en évidence de façon certaine. Sa réhabilitation depuis quelques années permet de voir son importance. Elle est capable d'induire une perte de poids dans des modèles murins obèses en favorisant la conversion des adipocytes blancs en adipocytes bruns. Ce mécanisme se fait par la stimulation de l'expression du gène UCP-1 dans le WAT. Ce changement permet l'augmentation du nombre de mitochondries impliquées dans la thermogénèse et de la sensibilité à l'insuline[172]. De plus, l'irisine joue un rôle d'inhibiteur sur la différenciation des adipocytes en diminuant encore plus la quantité de WAT[173] [Figure 31].

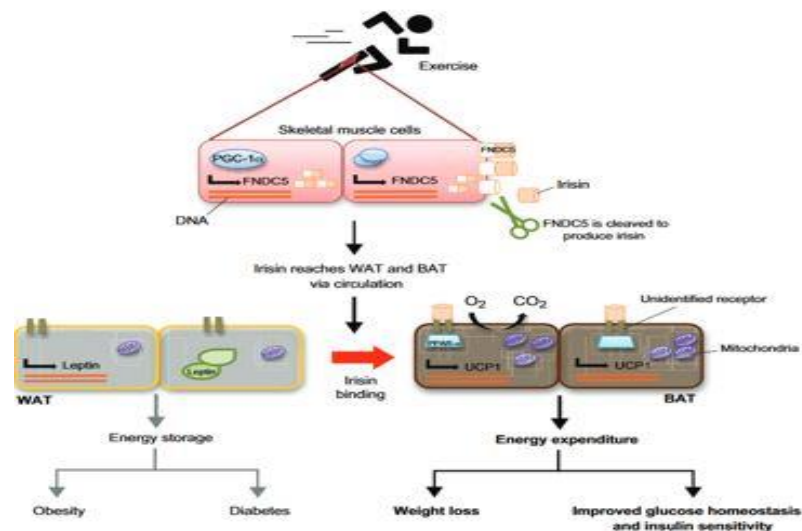


Figure 31 : Induction de l'irisine par l'activité physique et mécanisme d'action sur les WAT pour produire du BAT.
D'après Castillo-Quan et al 2012.

Au niveau de l'os, l'irisine à faible dose, est capable d'augmenter l'épaisseur et la minéralisation de l'os cortical[174]. Elle favorise aussi la formation osseuse grâce à une action directe sur les cellules ostéoblastiques[170]. Des corrélations ont mis en évidence des relations positives entre la quantité d'irisine et la DMO ou avec le métabolisme osseux en général[175]. Une étude récente, sur des souris en suspension (train arrière en décharge) a mis en évidence le rôle bénéfique contre la perte osseuse et l'atrophie musculaire d'un traitement par injection d'irisine à des doses faibles (100 µg/kg/semaine)[176]. Finalement, chez des femmes ménopausées, le taux d'irisine sérique est inversement corrélé avec le taux de fractures. Le taux d'irisine n'est pas modifié par 3 mois de traitement anti-ostéoporotique tel que le denosumab ou téraparatide[177]. Il semblerait que l'irisine puisse être un marqueur indépendant de l'ostéoporose et de la fragilité osseuse.

b) Ostéokines

L'os apparaît désormais comme un centre de régulation majeur dans l'homéostasie du métabolisme énergétique global du corps humain et produit des cytokines appelées : ostéokines.

La principale ostéokine est l'ostéocalcine. Son mode d'action est complexe, car elle existe sous plusieurs formes avec des effets différents. La production de l'ostéocalcine est stimulée par la

vitamine D ou l'insuline. Le gène de l'OCN est ensuite transcrit et traduit en une prépro-OCN puis en une pro-OCN. [178] [Figure 32]. C'est à cette étape que les isoformes vont être formés. Soit la protéine reste dans sa configuration actuelle et devient l'OCN décarboxylée, soit elle subit une modification d'un de ces 3 acides glutamiques (Glu) en acide gamma-carboxy-glutamique (Gla) sur sa chaîne peptidique. De ce fait, elle devient carboxylée (cOCN). La forme cOCN a une affinité importante pour l'hydroxyapatite de la matrice osseuse nouvellement formée par l'ostéoblaste alors que l'ucOCN va être sécrétée dans la circulation. La forme cOCN est majoritaire. La forme ucOCN est donc la forme active de l'OCN alors que la cOCN est la forme inactive[179]. Lorsque l'os est résorbé par les ostéoclastes, il y a libération des cOCN. Celles-ci sont décarboxylées en ucOCN grâce à l'acidité (pH = 4,5) de la lacune de résorption et relarguées dans la circulation. La production de l'OCN est donc régulée par les ostéoblastes et les ostéoclastes. L'obésité et la résistance à l'insuline sont donc des régulateurs négatifs de la production et l'activation de OCN.

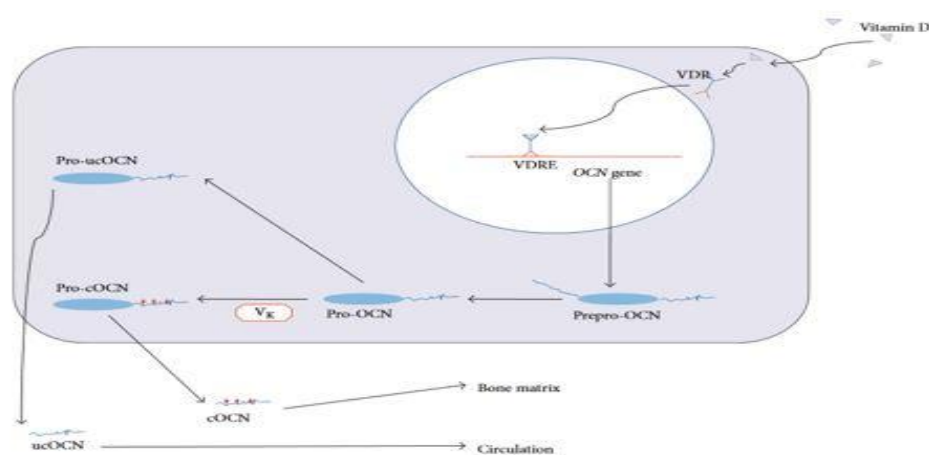


Figure 32 : Schéma de la synthèse de l'OCN et de sa gamma-carboxylation dans les cellules ostéoblastiques. D'après Shao et al 2015.

L'ostéocalcine agit sur les TA blanc et brun. Sur le BAT, elle contribue à l'augmentation d'UCP-1 et de Pgc-1 α et donc à une dépense d'énergie supérieure[178]. Au niveau du WAT, l'OCN permet l'activation de plusieurs voies pas encore complètement décrites. Il a cependant été mis en évidence qu'une augmentation de l'OCN favorisait la sécrétion par le WAT d'adiponectine[180]. Cette adipokine est importante dans les mécanismes de sensibilité à l'insuline. L'OCN augmenterait également la prise de glucose par ces cellules et diminuerait le processus de lipolyse. Toutes ces modulations se font dans l'optique d'améliorer le métabolisme énergétique.

Au niveau des muscles, l'OCN se fixe sur son récepteur GPRC6A à la surface des myocytes[179]. Dans un premier temps, l'OCN active la voie AMPK mTOR, voie de régulation positive de la masse et de la fonction musculaire. Elle intervient aussi dans la thermogénèse par augmentation du nombre de mitochondries et des protéines associées UCP1 et de Pgc-1 α [181]. L'OCN joue également un rôle dans le métabolisme glucidique (augmentation de la captation, sensibilité à l'insuline)[107]. Ces modulations sont importantes pour permettre aux tissus musculaires de s'adapter aux variations de l'environnement extérieur. Dans les conditions d'obésité, l'OCN étant diminuée, ces actions sont-elles aussi moindres. Les conséquences sont la résistance à l'insuline et au glucose dans les tissus adipeux et musculaires, une diminution de la dépense énergétique au profit du stockage et donc une augmentation des TA. Tout cela conduit à créer un cercle vicieux[182].

La sclérostine (SOST) est aussi une ostéokine importante dans la régulation métabolique. Bien que ses mécanismes d'actions ne soient pas encore totalement connus, plusieurs études ont mis en évidence des effets sur les tissus musculaires et adipeux. La sclérostine est sécrétée par les ostéocytes (mécano-senseurs du tissu osseux) lors d'une diminution de la charge appliquée au tissu. Il est également exprimé par les chondrocytes hypertrophique et possède une action inhibitrice de la formation de collagène de type II en condition hypoxique[183]. Cette voie est fortement augmentée dans l'arthrose. Les effets de la sclérostine ne sont pas les mêmes en fonction de leur lieu de production. Une augmentation anormale de SOST par les ostéocytes à un effet négatif sur l'os. Alors qu'une augmentation de la sécrétion par les chondrocytes hypertrophiques protège de la dégradation du cartilage[184]. A l'heure actuelle, des essais cliniques de phase 3, vise la sclérostine comme effet anti-ostéoporotique sont en cours. Cette cytokine inhibe la voie Wnt dans les ostéoblastes, en se fixant sur le co-récepteur de Frizzled, LRP5/6 [185]. Cette voie stimule normalement la formation osseuse et inhibe l'ostéoclastogénèse et de la perte osseuse. En effet, une inhibition de Wnt par la sclérostine conduit donc à une augmentation de la résorption et une baisse de la formation[107]. Dans le muscle, par les canaux calciques, elle active les voies Wnt (Wnt3a et Wnt4), ce qui permet d'induire la différenciation des myoblastes plutôt que leur prolifération et pouvant conduire à la sarcopénie[186]. Il semblerait aussi que la sclérostine joue un rôle dans le métabolisme énergétique musculaire en favorisant la résistance à l'insuline et en diminuant la captation du glucose[187], [188]. Au niveau du TA, les études sont peu nombreuses, mais le KO de la

sclérostine dans un modèle murin induit une augmentation importante du WAT et l'émergence d'un diabète de type 2[186]. L'implication de cette ostéokine est importante, mais toutes ces ramifications ne sont pas encore connues.

Une autre ostéokine importante est le FGF 21 (Fibroblast growth factor 21). Il fait partie de la superfamille des FGF et est sécrété par le tissu osseux en réponse à de nombreux stimuli extérieurs, comme le stress physique (exercice, régime cétogène), le stress pathologique (obésité, anorexie, néphropathie) et finalement en réponse à des troubles cellulaires (stress oxydatif, déficience mitochondriale) [189] [Figure 33]. Il est considéré comme une cytokine de réponse au stress. Par ce fait, le FGF 21 agit sur les cellules musculaires, en favorisant l'entrée du glucose (grâce à l'augmentation des transporteurs GLUT1 à la membrane) dans la cellule[190]. Il est aussi impliqué dans les mécanismes mitochondriaux par son action sur PGC-1 α et sa régulation de l'homéostasie énergétique du muscle. Dans les conditions d'obésité, le

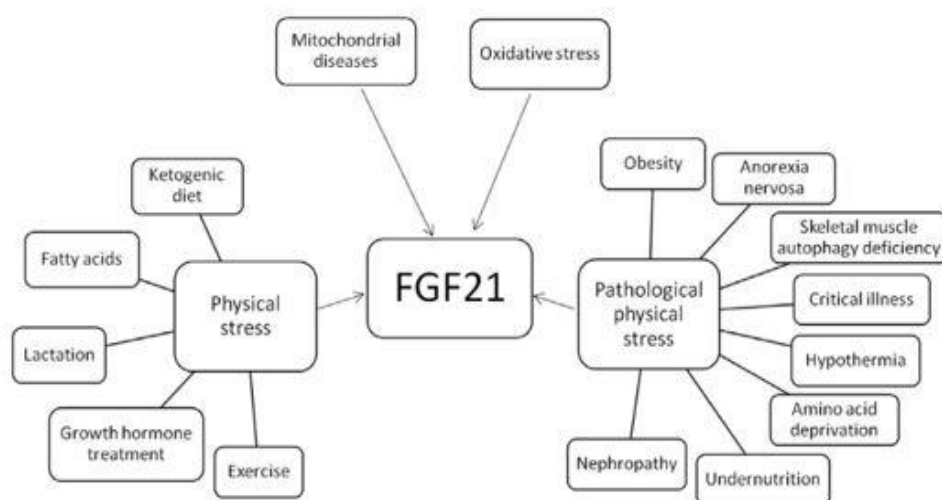


Figure 33 : Différentes voies de stimulation conduisant à la production de FGF 21 dans les cellules. D'après Gómez-Sámano et al 2017.

FGF 21 est fortement augmenté dans la circulation sanguine, mais son effet est réduit. En effet, dans ces conditions, les récepteurs cellulaires du FGF 21 sont drastiquement diminués. L'augmentation sanguine est seulement une tentative de compensation de l'organisme pour garder un signal équivalent[191]. Mais même lorsque la liaison molécule-récepteur se fait, le signal est dégradé par la présence en excès de palmitate dû à l'obésité dans les cellules[192]. Dans ces conditions, les effets bénéfiques et anti-stress du FGF-21 sont annihilés. Sur le WAT,

le FGF 21 augmente la dépense énergétique en favorisant le passage des WAT au BAT par up-régulation de UCP 1 et PGC-1 α . Ces deux protéines sont impliquées dans le « browning » du WAT[193]. L'activation de cette voie permet de lutter dans les 1^{ers} temps contre l'installation et la mise place de l'obésité, en augmentant la dépense d'énergie[194]. En se fixant sur ces récepteurs, FGF 21 va interagir également avec PPAR- γ pour promouvoir le métabolisme énergétique des cellules adipocytaires[195]. Comme au niveau musculaire, dans les conditions d'obésité, le taux sanguin de FGF 21 est élevé mais ces récepteurs adipocytaires sont eux fortement diminués[196] [Figure 34]. Les voies sont alors moins actives et conduisent aux effets négatifs de l'obésité. Le FGF 21 intervient aussi au niveau du pancréas pour maintenir l'activité des îlots sécréteurs d'insuline et maintenir un stade d'inflammation bas[197].

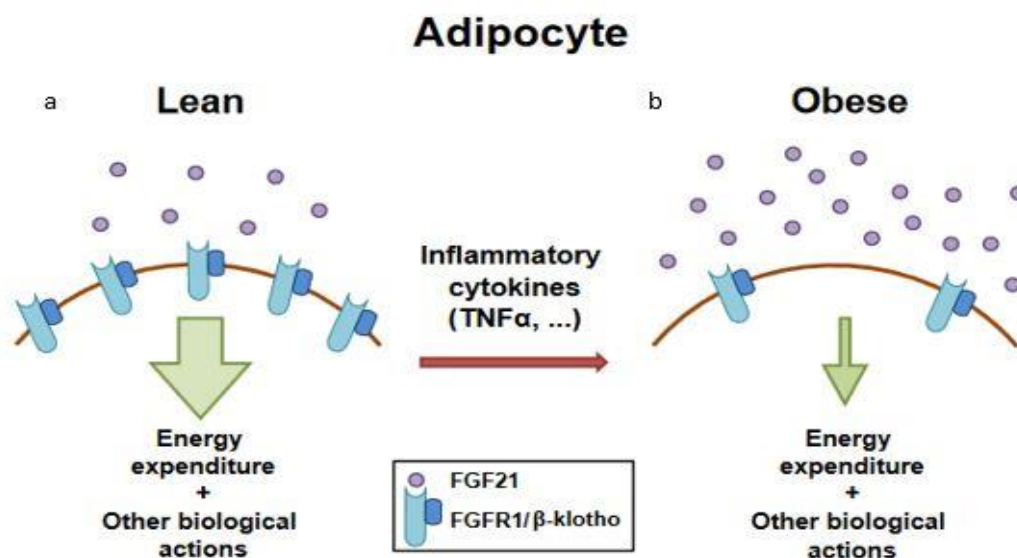


Figure 34 : Représentation schématique des interactions de FGF-21 et de son récepteur. En condition (a) normale et en condition (b) obèse. D'après Giralt et al 2015.

La dernière ostéokine que nous allons décrire est le FGF 23 (Fibroblast growth factor 23). Il s'agit d'une cytokine faisant partie de la famille des FGF comme le FGF 21. Elle est sécrétée majoritairement par les ostéocytes et plus faiblement par les ostéoblastes matures. Son action principale est l'excrétion rénale du phosphate. Il intervient aussi dans la régulation des mécanismes de la vitamine D[198]. Le FGF 23 et son cofacteur Klotho sont souvent associés au métabolisme rénal du fait de ses actions sur le phosphate. Une concentration sanguine élevée en FGF 23 est un signe clinique d'une maladie rénale chronique[107]. D'autres études ont mis en avant le rôle inhibiteur du FGF 23 dans les régulations de la PTH (hormone

parathyroïdienne)[199]. Cependant, son implication dans le métabolisme énergétique reste encore peu décrite même si plusieurs études ont mis en évidence l'effet négatif du FGF 23 sur la sensibilité à l'insuline et le syndrome métabolique, mais uniquement pour des obésités avec un HOMA-IR élevé[200]. A l'heure actuelle, il y a peu de recherche sur les effets du FGF 23 sur le tissu musculaire. Les études existantes montrent qu'une augmentation sérique de la cytokine est corrélée avec une hypertrophie des ventricules cardiaques[201]. De plus, l'exercice physique est un stimulateur de la production de FGF 23, lui-même inhibant la formation des ROS et activant les fonctions mitochondriales et donc les métabolismes musculaires[202]. Malgré cela, une augmentation de FGF 23 circulant est associée à des dysfonctionnements vasculaires importants[203]. Cette augmentation est retrouvée dans l'obésité. Des travaux ont montré une corrélation entre l'augmentation de la masse grasse abdominale et la concentration de FGF 23 circulant, mais aussi avec le syndrome métabolique[204]. Bien que peu décrit dans les modèles musculaires et d'obésité, le FGF 23 est une ostéokine très importante dans la régulation osseuse et plus globalement de la régulation générale.

L'os possède grâce à ces ostéokines un rôle fondamental dans la régulation des mécanismes métaboliques du corps entier. Il apparaît aujourd'hui impensable de ne pas intégrer les tissus osseux dans le schéma global de la régulation tant son apport est grand.

a) *Adipokines*

Le tissu adipeux a un rôle central dans la régulation du couplage métabolique avec les tissus osseux et musculaires. Par la sécrétion de nombreuses adipokines, le tissu adipeux permet une régulation précise des métabolismes énergétiques et cellulaires des organes cibles.

Parmi ces adipokines, une des plus connues est l'adiponectine, majoritairement produite par les adipocytes, mais aussi par les ostéoblastes[205], [206]. Cette adipokine a deux récepteurs connus différents qui sont AdipoR1 et AdipoR2. Leur affinité et leur répartition ne sont pas les mêmes. En effet AdipoR1 est ubiquitaire dans tous les tissus, mais particulièrement au niveau musculaire. Il présente une affinité pour la forme globulaire circulante (la plus abondante) de l'adiponectine. A l'opposée, le récepteur AdipoR2 est présent dans peu de tissus dont le foie et reconnaît la forme entière de l'adiponectine circulante[207].

Son rôle antidiabétique par augmentation de la sensibilité à l'insuline des muscles est bien admis [208]. De plus, elle possède un rôle protecteur contre la mise en place de l'obésité[209] et du syndrome métabolique[210]. Dans les études épidémiologiques, le taux sanguin de l'adiponectine varie suivant la sévérité de l'obésité et son profil métabolique[210]–[212]. Il apparaît que plus l'obésité est sévère plus le taux d'adiponectine est faible ; en revanche, son taux augmente lors d'une perte de poids. Il se pourrait qu'une diminution de l'adiposité augmente la sensibilité à l'insuline des adipocytes ce qui permettrait une plus grande sécrétion d'adiponectine[212].

Dans l'os, en plus d'être sécrétée par les ostéoblastes, l'adiponectine joue un rôle d'inhibiteur de la résorption osseuse[213]. La fixation de l'adiponectine sur son récepteur AdipoR1 active la voie de signalisation passant par APPL1[214, p. 1]. Celle-ci inhibe la phosphorylation de AKT1 et donc diminue l'apoptose des ostéoblastes[213]. [Figure 35]. L'adiponectine stimule également la prolifération des ostéoblastes par la voie FoxO1 [215]. Elle régule donc l'ostéogénèse[216]. L'adiponectine permet d'influencer le lignage des cellules-souches mésenchymateuses osseuses, soit vers la voie adipocytaire, soit ostéoblastique. Le fait que les ostéoblastes puissent sécréter de l'adiponectine est un avantage pour l'orientation des cellules-souches

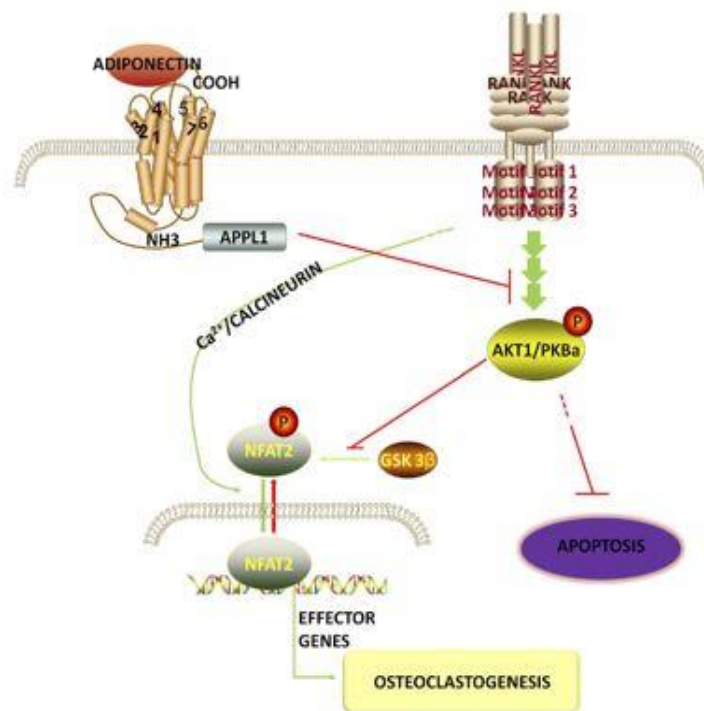


Figure 35 : Voie de signalisation dans les ostéoclastes après une induction par l'adiponectine. D'après Tu et al 2011

vers la voie osseuse. Il y a une corrélation positive entre le taux sérique d'adiponectine et la DMO[217]. La diminution de l'adiponectine chez les sujets obèses pourrait expliquer en partie la diminution de la DMO[14], mais aussi l'augmentation de la résorption et la diminution de la formation osseuse par les ostéoblastes.

Au niveau du muscle squelettique, une diminution du taux circulant d'adiponectine ou une baisse de signal des récepteurs membranaires des cellules musculaires conduit à l'apparition de la résistance au glucose et à l'insuline, voir à l'apparition d'un diabète de type 2[218]. La production d'adiponectine entraîne au niveau du muscle une diminution de la synthèse du glycogène, une augmentation de la captation et de l'oxydation des acides gras libres et de la captation du glucose par augmentation des transporteurs GLUT4[219] [Figure 36]. La concentration d'adiponectine est diminuée lors de l'obésité[218], comme dans l'os, cela entraînent la diminution de l'activité des voies AMPK et Akt et donc de la captation du glucose par les cellules[220]. Les adipocytes présents dans le muscle ont aussi la capacité de sécréter de l'adiponectine[218]. Quand elle est fortement sécrétée, l'adiponectine permet la diminution des IMAT et l'augmentation de la taille des fibres de type 2[94]. En revanche lors de l'obésité sa quantité est diminuée et les effets sont l'augmentation des IMAT et la résistance des cellules à l'insuline.

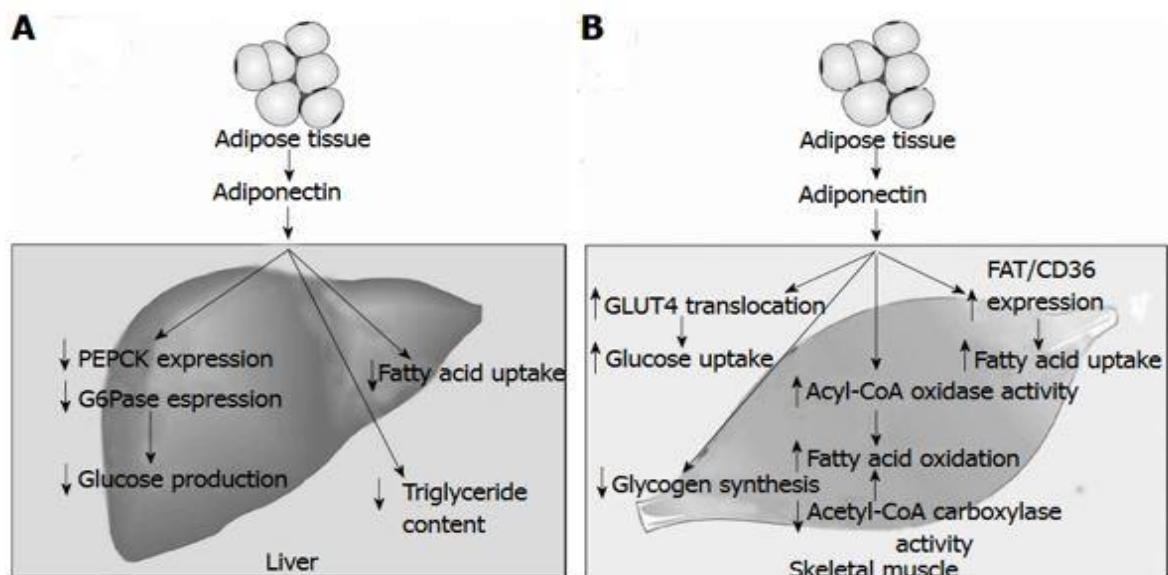


Figure 36 : Effet de l'adiponectine sur le métabolisme des lipides et des carbohydrates. (a) le foie et dans (b) le muscle. D'après El-Abhar et al 2014.

D'autres adipokines interviennent dans la régulation du couplage métabolique entre le muscle et l'os. C'est le cas de la visfatine et de la résistine par exemple. Ces deux adipokines ont des rôles semblables dans le métabolisme énergétique.

La visfatine (aussi appelée PBEF ou Nampt) est produite par les WAT de l'organisme. Elle existe sous 2 formes différentes, soit une forme intracellulaire avec une action proche de la nicotinamide, soit une forme extracellulaire avec une action pro-inflammatoire, mais utilisant les mêmes voies que l'insuline[221]. L'augmentation de sa concentration circulante est associée à l'obésité et la résistance à l'insuline[222]. Au niveau de l'os, la présence de visfatine stimule les récepteurs à l'insuline (IR, IRS-1 et 2) des ostéoblastes ainsi que leur prolifération. La visfatine par son action sur les ostéoblastes bloque la voie de production de RANK et donc la différenciation des pré-ostéoclastes en ostéoclastes[223]. Elle favorise aussi l'engagement des cellules mésenchymateuses vers la voie adipocytaire plutôt que la voie ostéoblastique [224]. Au niveau musculaire, le rôle de la visfatine est moins connu. Une sédentarité importante augmenterait le taux de visfatine musculaire et s'accompagnerait d'une perte musculaire par des mécanismes encore inconnus. A l'opposé, l'exercice diminue le taux de visfatine musculaire et augmente le métabolisme énergétique[170], [225]. A contrario, des études montrent des effets bénéfiques de la visfatine sur le métabolisme glucidique dans les cellules musculaires[221]. Les mécanismes d'action de la visfatine sont encore loin d'être connus mais elle semble avoir un rôle important dans les mécanismes métaboliques de l'os et du muscle.

La résistine est une adipokine produite par les adipocytes et les macrophages du WAT. Elle est souvent décrite comme étant l'antagoniste de l'adiponectine[226]. Sa concentration est fortement augmentée dans les cas d'obésité. La résistine joue un rôle dans le remodelage osseux en stimulant l'ostéoclastogenèse (par stimulation de la voie NF- κ B) et la prolifération des ostéoblastes (par les voies impliquant les PKC et PKA)[227]. Cependant, il a été retrouvé une corrélation négative entre la DMO et le taux circulant de résistine. Lors de l'obésité, l'augmentation de la résistine peut donc être un des facteurs impliqués dans la perte de masse osseuse[228]. Dans les muscles, la résistine induit une résistance à l'insuline et à la diminution de la captation de glucose par les cellules. Ce mécanisme se fait par action sur les voies AMPK, Akt et GLUT4[229]. La résistine conduit aussi à la diminution de l'entrée des acides gras libres dans les cellules musculaires en diminuant le transporteur FAT/CD36 et les enzymes de

transformations des FFA dans la cellule[230], [231]. Cette adipokine a aussi un rôle dans l'inflammation, car elle augmente la production de TNF- α , d'IL-6, IL-1.

Le TA et les adipokines ont un rôle central dans la régulation des mécanismes métaboliques au niveau des systèmes osseux et musculaires.

b) *Autres Cytokines*

Certaines cytokines sont ubiquitaires c'est le cas de la famille des interleukines, qui un rôle inflammatoire (pro ou anti). Les molécules majoritairement impliquées sont les IL-6, IL-10 et TNF- α .

Une élévation chronique d'IL-6 est retrouvée dans le sang chez les personnes sédentaires ou présentant un syndrome métabolique, dans ce cas, elle a un rôle pro-inflammatoire. En revanche une élévation aiguë lors de la contraction musculaire favorise le métabolisme énergétique en augmentant la consommation de glucose dans le muscle ainsi qu'en activant la formation osseuse. L'effet est dans ce cas anti-inflammatoire[228]. [Figure 37].

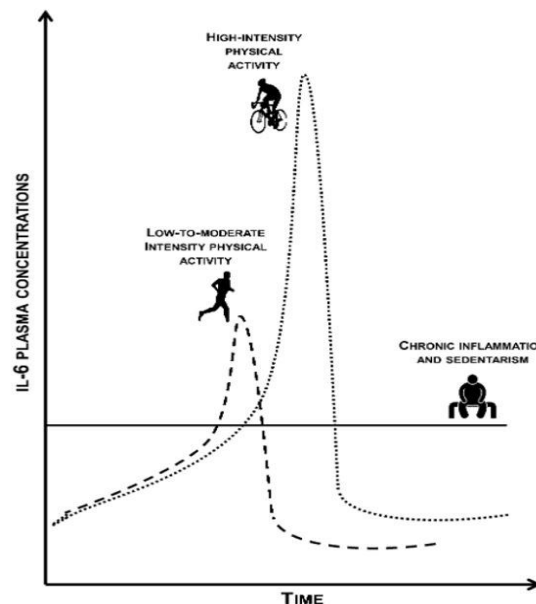


Figure 37 : Variation de la concentration d'IL-6 en fonction des activités (sédentaire, modérée et intense).

D'après Lombardi et al 2016.

Dans des conditions d'obésité, l'inflammation chronique et les taux d'IL-6 sont supérieurs à ceux observés chez des personnes saines. Les concentrations élevées conduisent dans le

muscle à l'augmentation de SOCS3 (impliqué dans la résistance à la leptine) et de la voie JAK-STAT3 (active les voies de l'apoptose) et diminue IGF-1[231]. Chez des personnes pratiquant un sport d'endurance, des pics d'IL-6 sont observés durant l'activité physique, mais les taux basaux de la molécule sont plus faibles que chez des personnes normales[228]. L'IL-6 joue donc un rôle dans la communication os-muscle, mais son action est variable en fonction de la chronicité de sa production.

Dans l'os, l'IL-6 interagit avec Runx2, Osterix ou l'OCN, régulateurs importants de la différenciation ostéoblastique[232, p. 6]. IL-6 intervient au niveau des voies SHP2 MEK ERK et SHP2 PI3K AKT2 pour diminuer l'ostéoblastogenèse. De plus, il a été montré que l'IL-6 agissait directement sur le passage des pré-ostéoclastes en ostéoclastes matures[233]. Dans l'obésité, les concentrations en IL-6 étant augmentées, les actions sur le tissu osseux sont donc exacerbées et le renouvellement osseux se déplace plus vers la destruction que la formation osseuse[234].

L'IL-6 est majoritairement produite par les cellules immunitaires du TA et influence par un rétrocontrôle positif ce même tissu. Plus sa concentration est élevée plus le TA produira de l'IL-6. Cela crée un environnement inflammatoire qui se retrouve dans les processus de l'obésité[235].

L'IL-10 est aussi une cytokine, mais avec un rôle anti-inflammatoire. Elle intervient dans le métabolisme de régulation du tissu osseux, musculaire et des adipocytes. Son action est antagoniste de celle de l'IL-6. L'IL-10 est sécrétée par les cellules de l'immunité comme les macrophages de type M2 (anti-inflammatoire) et les monocytes en réponse à une augmentation de la réponse inflammatoire (activé par la fixation du TNF- α sur ces récepteurs macrophagiques) ou du stress oxydatif[236]. L'IL-10 inhibe la voie IKK et NF- κ B et donc diminue la mise en place de l'inflammation[237].

Au niveau osseux, l'IL-10 inhibe l'ostéoclastogenèse. En effet, lorsqu'IL-10 est présent dans l'environnement osseux, la production de RANKL est diminuée[238] et donc la différenciation des ostéoclastes est plus faible. Il y a aussi une corrélation entre la quantité d'IL-10 et la DMO [239]. Dans les cas d'obésité, la production d'IL-10 est diminuée au profit du TNF- α et du NO

par les macrophages[240]. Cela favorise la mise en place d'une inflammation de bas grade[241]. Chez des souris obèses, l'injection d'IL-10 diminue la perte osseuse par inhibition de l'ostéoclastogenèse [240]. La diminution d'IL-10 avec l'augmentation de l'obésité ne permet plus la protection contre la perte osseuse.

Au niveau du muscle, l'IL-10 joue aussi un rôle de protection contre la perte musculaire et l'augmentation du TA. L'IL-10 contrebalance les effets de l'induction de l'IL-6 dans l'activation des voies de dégradation des tissus[242]. Elle intervient dans la préservation de la sensibilité à l'insuline lors des premiers stades de l'obésité[243]. En revanche, lorsque l'obésité est installée, la production d'IL-10 est remplacée par une production d'IL-6 accrue et donc par la mise en place d'un état inflammatoire.

Dans le tissu adipeux, l'IL-10 agit aussi comme protecteur de la mise en place de l'inflammation. La cytokine est produite par les macrophages M2 du TA et agit directement sur la régulation négative des macrophages de type M1 (pro-inflammatoire) présents dans le tissu[244] [Figure 38]. Lors de l'obésité, le rapport de force macrophage de type M2/M1 se déplace vers l'augmentation du type M1. L'effet inhibiteur de l'IL-10 est donc trop faible pour lutter contre la mise en place de l'inflammation médiée par les macrophages de type M1 et les cytokines sécrétées par ceux-ci.

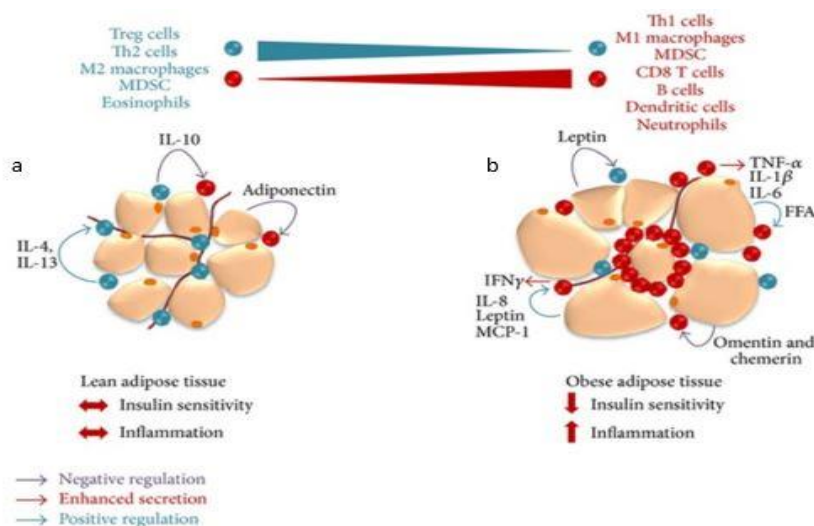


Figure 38 : Schématisation des macrophages des TA et des molécules sécrétées. Dans les conditions normales (a) et d'obésité (b). D'après Makki et al 2013.

Le TNF- α est aussi une des cytokines inflammatoires ayant un rôle important dans la régulation croisée des métabolismes des tissus adipeux, osseux et musculaires. Il s'agit d'un facteur avec une action pro-inflammatoire comme l'IL-6. Il est lui aussi sécrété par les macrophages de type M1. Comme beaucoup de cytokines inflammatoires, sa concentration est augmentée dans les conditions d'obésité.

Dans le tissu osseux, le TNF- α est décrit comme ayant un rôle d'inhibiteur de la différenciation des ostéoblastes. Sa fixation sur les récepteurs des pré-ostéoblastes conduit à l'augmentation de l'AMPc et de NF- κ B. Cela entraîne en parallèle l'inhibition des facteurs RUNX2 et ALP. Ces deux voies conduisent à la diminution de la différenciation des ostéoblastes et donc à une formation osseuse réduite[245]. De plus, le TNF- α apparaît comme un acteur dans l'activation et la différenciation des ostéoclastes matures par l'activation des voies JNK[246]. Dans les cas d'obésité, l'augmentation importante de TNF- α dans la circulation exacerbe ces voies de signalisation et renforce l'action de destruction osseuse par inhibition de la formation et augmentation de la résorption.

Dans le métabolisme musculaire, le TNF- α active les voies conduisant à l'atrophie et l'apoptose en activant les facteurs NF- κ B et p38/MAPK[247], [248] [Figure 39]. Cela entraîne une diminution de la production et une dégradation des protéines musculaires existantes. Des études sur des sujets obèses ont mis en avant l'effet du TNF- α sur le métabolisme du glucose dans le muscle. Les mécanismes impliqués favorisent la production de TNF- α qui lui active la voie JNK-1 conduisant à la diminution de la sensibilité à l'insuline[249] et par ricochet à la résistance au glucose.

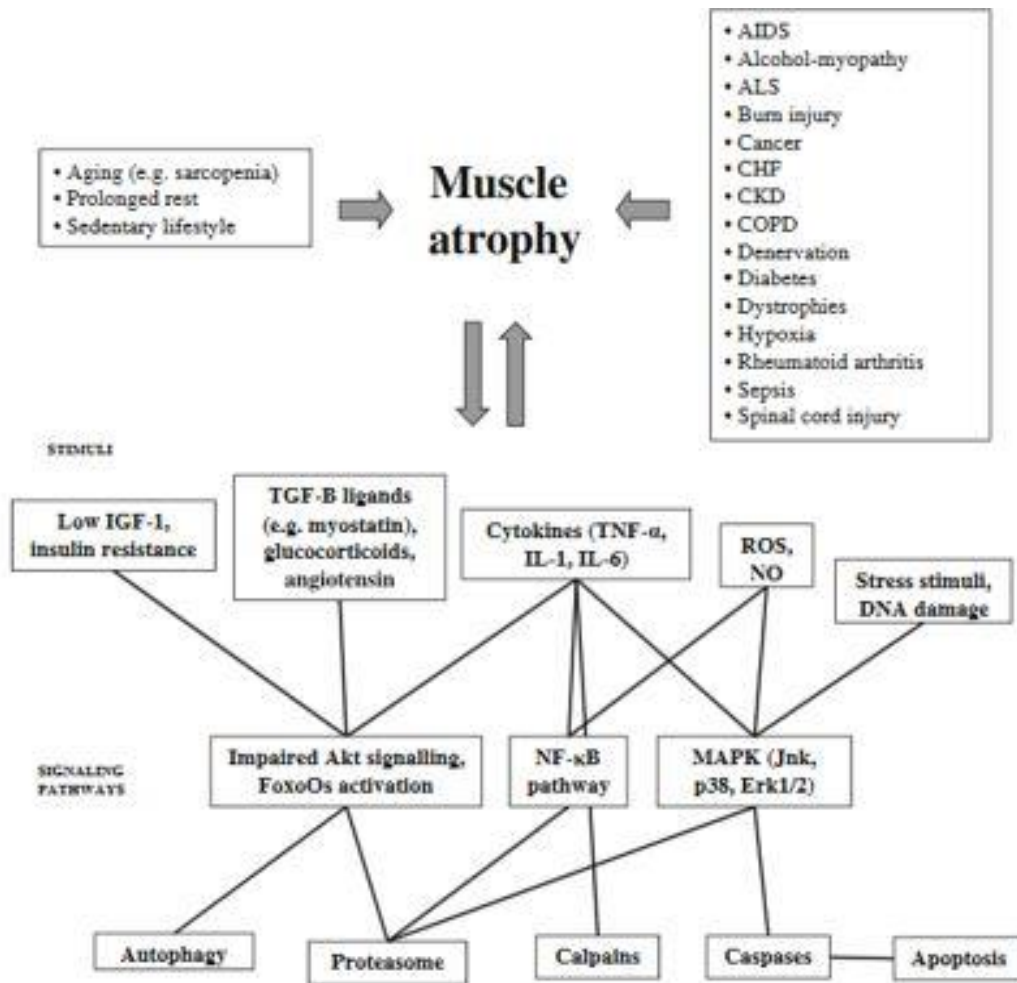


Figure 39 : Principaux mécanismes d'induction de l'atrophie musculaire et les voies cellulaires mise en œuvre. D'après Fanzani et al 2012.

L'augmentation du tissu adipeux dans l'obésité est corrélée à l'infiltration de macrophages pro-inflammatoires et donc à une production de TNF-α favorisée. Cette augmentation agit comme une boucle activatrice sur sa propre activation.

Ces 3 cytokines interviennent dans la communication entre les tissus, mais aussi avec leur tissu d'origine. Leurs implications dans les mécanismes d'action (positifs ou négatifs) sont importantes pour la régulation globale du corps humain.

C. Vascolarisation et innervation

Si le réseau sanguin établit une communication entre tous les tissus et organes, les tissus irrigués ont eux-mêmes une action directe sur leur vascularisation. Le tissu adipeux par

l'augmentation de la Thrombospondine-1 (TSP-1) et la diminution d'Angiopoietin-1 (Ang-1), augmente sa vascularisation au détriment des autres tissus[250]–[252]. Ainsi, chaque adipocyte se retrouve entouré de plusieurs capillaires. Cela permet à la cellule grasseuse de sécréter de nombreuses hormones et cytokines dans la circulation afin de réguler les autres tissus[250]. Dans l'obésité, le tissu adipeux est augmenté et son action sur la vascularisation est renforcé. Au niveau osseux, l'obésité induit une diminution de la formation de nouveaux vaisseaux. D'après certaines études, cette diminution serait la conséquence de l'inflammation de bas grade provoquée par l'obésité et les cytokines provenant du tissu adipeux[253]. Parallèlement, le tissu musculaire par le biais du VEGF et d'HIF-1 α stimule l'angiogenèse [254], [255]. Le rôle de la vascularisation est primordial dans la communication entre les différents tissus, mais son action et sa mise en place restent tout de même très peu connue dans la triade os - muscle - tissu adipeux.

Même si l'innervation ne sera pas traitée dans cette thèse, elle joue un rôle important dans l'homéostasie du corps. Les deux intervenants sont les systèmes nerveux centraux et périphérique (SNP). Ils sont impliqués dans l'obésité, pour la régulation de la prise de nourriture (signaux régulant la sécrétion des hormones) ainsi que la captation des différents nutriments par les tissus (glucose par le muscle)[256]. Le SNC et SNP sont aussi impliqués dans l'OA avec la régulation de la douleur et dans la mise en place de la vascularisation, mais aussi dans les mécanismes impliqués dans la perte osseuse[257]. Le rôle du système nerveux et de l'innervation dans la mise en place de l'obésité et de l'arthrose est important, mais reste peu exploré.

Objectifs et hypothèses

Dans la littérature, il existe de nombreuses études sur l'évolution du statut osseux sous différentes conditions d'obésité et d'arthrose. Certaines études ont aussi couplé les deux conditions afin de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents de l'un sur l'autre.

Au regard de toutes ces études, nous avons déterminé plusieurs objectifs et hypothèses permettant essentiellement d'explorer l'os, le muscle et leur invasion graisseuse dans des conditions physiopathologiques particulières.

Notre travail comprend 4 grandes parties :

Partie 1 : L'objectif est de caractériser les modèles d'OA et d'obésité afin de pouvoir les utiliser par la suite comme modèles de référence.

L'hypothèse est que l'induction chirurgicale de l'OA ou l'induction de l'obésité par régime HFD vont conduire à une articulation plus fragile et des paramètres métaboliques dégradés.

Partie 2 : L'objectif est d'identifier dans l'obésité, séparément, les effets mécaniques des effets métaboliques sur le système musculo-squelettique et d'analyser les facteurs de couplage entre os et muscle chez des animaux obèses non arthrosiques.

L'hypothèse est que la surcharge pondérale de l'obésité mimée par l'hypergravité, dite obésité mécanique « M » pourrait renforcer le système musculo-squelettique contrairement à l'obésité pathologique, dite « MM », qui combine la charge mécanique et les troubles métaboliques [Figure 40a].

Partie 3 : Dans cette partie l'objectif est double. Dans un premier temps, il s'agit de comparer le système musculo-squelettique entre OA et non OA chez les animaux contrôles d'une part et obèses MM et M, d'autre part [Figure 40b].

L'hypothèse est que les animaux OA contrôles et OA MM ont un système musculo-squelettique plus fragile que les animaux OA M.

Dans un second temps, l'objectif est d'analyser, chez des animaux OA, si l'obésité MM ou M, aggrave les troubles musculo-squelettiques de l'OA seule. Les différences dans les réponses os-muscle des différents groupes seront évaluées.

L'hypothèse est que chez les obèses MM, l'OA va accentuer la dégradation des paramètres osseux et musculaires de manière plus importante que chez les obèses M [Figure 40c].

Partie 4 : L'objectif est de tester les vibrations corps entiers comme contre-mesure à l'évolution de l'OA et de l'obésité dans un modèle d'obésité métabolique par le renforcement du système musculo-squelettique.

L'hypothèse est que les vibrations corps entiers permettent de réduire l'aggravation de l'obésité et de l'OA par un renforcement du système musculo-squelettique.

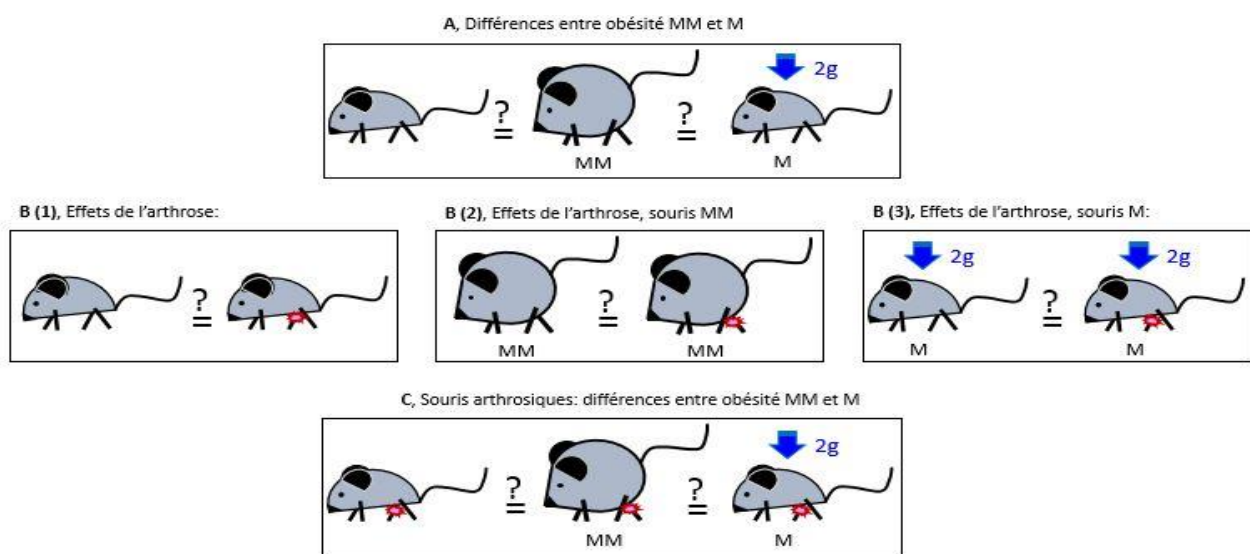


Figure 40 : Etude de l'appareil musculo-squelettique dans les différentes configurations

A, souris non arthrosiques :différences entre obésité MM et M

B, souris avec ou sans arthrose, (1) Ctrl vs OA, (2) Ob vs OA Ob, (3) 2g vs OA 2g

C, souris arthrosiques : différences entre obésité MM et M

MM, Mécanique et Métabolique ; M, Mécanique ; OA arthrose ; Ctrl, contrôle ; 🌟 patte arthrosique

Matériels et Méthodes

I. Modèle animal

A. Animaux et régime

Tous les protocoles mis en place ont été validés par le comité d'éthique local (CEEAL-UJM, Comité d'Ethique en Expérimentation Animale de la Loire Université Jean Monnet) sous les numéros CU14N06 et CU15N06. Au total, 128 souris mâles C57Bl6/J (Charles River Laboratoires, l'Arbresle, France) ont été réparties aléatoirement en 8 groupes de 16 animaux chacun. [Figure 41]. Dans chacun des 8 groupes à la fin du protocole les souris sont réparties en 2 sous-groupes, un de 10 souris (perfusion au sulfate de baryum) et l'autre de 6 (non perfusée).

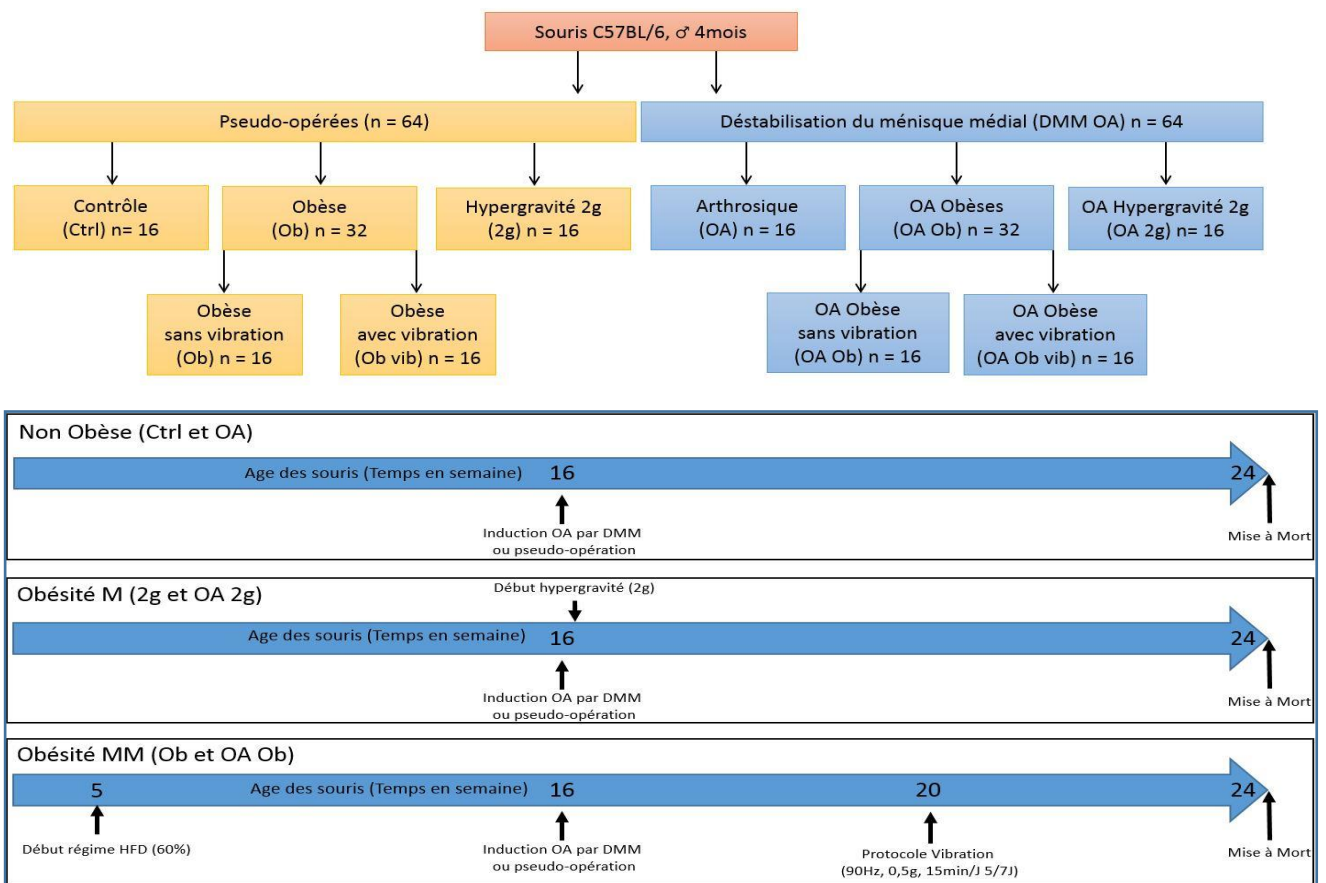


Figure 41 : Représentation schématique des différents groupes d'animaux utilisés dans l'étude (n = 128) et déroulement des expérimentations

Pour les groupes contrôles (Ctrl), arthrosiques (OA), contrôles 2g (2g) et arthrosiques 2g (OA 2g), les animaux en début du protocole sont âgés de 16 semaines. Cela correspond à une maturité au niveau des systèmes musculo-squelettiques. Pour les souris obèses (Ob), obèses

avec vibration (Ob vib), obèses arthrosiques (OA Ob) et obèses arthrosiques avec vibration (OA Ob vib), nous utilisons un régime obésogène qui débute à la 5^{ème} semaine de vie des animaux. Il se poursuit tout au long du protocole.

Le modèle d'obésité est un modèle complexe et son induction peut se faire de plusieurs manières, soit grâce par mutation génétique (modèle de souris ob/ob, par exemple), soit par un régime alimentaire. Il existe cependant de très nombreux régimes plus ou moins riches en sucre et en gras. Nous avons choisi ici un régime HFD 60% de gras. La quantité de sucre reste identique que celle des contrôles. Le détail de la composition en annexe 1 (fournisseur Sniff). Avec ce régime, nous espérons faire prendre 40% de poids de plus aux souris obèses. Un changement régulier (> 2 fois par semaine) est effectué afin de préserver la qualité de la nourriture obésogène. Celle-ci est conservée à 4°C.

Chaque groupe de souris est randomisé et chaque cage contient 3 ou 4 souris. La nourriture et l'eau sont ad libitum. Un cycle jour/nuit de 12h est instauré avec contrôle de la température (22°C) et de l'humidité constante (60%). L'ensemble des animaux hors protocole obèse est soumis à un régime classique (aliment d'entretien de lignée murine A03).

B. Mise à mort (MAM)

Le protocole dure 8 semaines à partir de la 16^{ème} semaine de vie. Les souris sont mises à mort à la 24^{ème} semaine de vie par dislocation cervicale en accord avec les lois d'éthiques. De plus, 7 et 2 jours avant la mise à mort les animaux reçoivent une injection avec une solution de tétracycline (37,5mg pour 10 ml de NaCl). L'injection est de 250 µL par animal en intrapéritonéal. La tétracycline se fixe sur le calcium libre et marque ainsi les fronts de minéralisation osseuse. Elle est visible en lumière ultraviolette.

C. Induction de l'arthrose

L'induction de l'arthrose marque le début du protocole. Elle se fait au cours de la 16^{ème} semaine de vie des souris. Huit semaines plus tard, une OA modérée est installée. L'induction de l'OA se fait par une déstabilisation du ménisque médial grâce à la section du ligament

ménisco-tibial interne de la patte postérieure droite [Figure 42]. Nous avons choisi cette méthode d'induction de l'OA car elle est couramment utilisée et permet une très bonne reproductibilité de l'OA. Un papier de Glasson et al [258], démontre bien l'efficacité du modèle DMM par rapport à d'autres modèles (ACLT par exemple), pour l'induction de l'OA dans les modèles murins.

L'opération se fait sous anesthésie gazeuse (isoflurane). La peau est incisée sur la face interne du genou droit pour visualiser la capsule et inciser le long du bord interne du tendon rotulien. Ceci permet de luxer la rotule et d'atteindre le ligament qui est, par la suite, sectionné. La rotule est remise en place et l'incision est refermée grâce à 2 points de suture. Durant toute l'opération et lors du réveil les animaux sont sur plateau chauffant. Les souris sont traitées en pré et post-opératoire par l'ajout dans l'eau de boisson de Meloxicam (0,5mg/ml, anti-inflammatoire non-stéroïdien, ayant des propriétés anti-inflammatoires, analgésiques et antipyrétiques).

Pour les souris des groupes contrôle, une incision est faite afin de conserver l'effet stressant que peut induire l'opération.

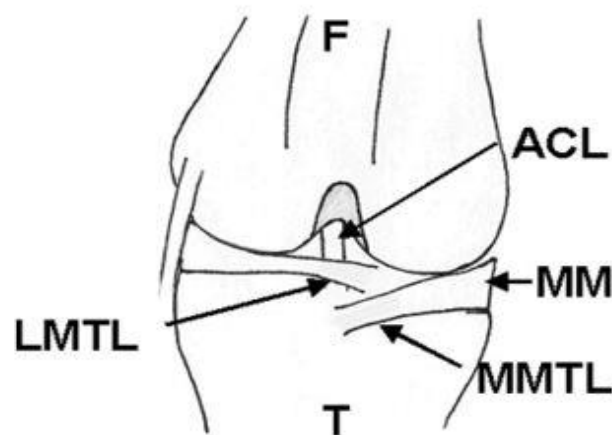


Figure 42 : Articulation du genou pour ménisectomie. vue antérieure
F = fémur; T = tibia; MM = ménisque médial; ACL = Ligament croisé antérieur; MMTL = Ligament ménisocotibial médian; LMTL = Ligament ménisocotibial latéral. D'après Glasson et al. 2007

II. Interventions sur souris vivante

A. Modèle d'hypergravité

Après une semaine d'acclimatation avant le début du protocole et deux jours après l'induction de l'OA, les animaux sont transférés dans les nacelles (56.2cm x 52cm x 59.2cm) de la centrifugeuse (rayon de 1,4m) sur la plateforme d'hypergravité (PLEXAN). La centrifugeuse (COMAT Aérospace, Flourens, France) permet de créer artificiellement une hypergravité et de la maintenir sur une longue période [Figure 43].

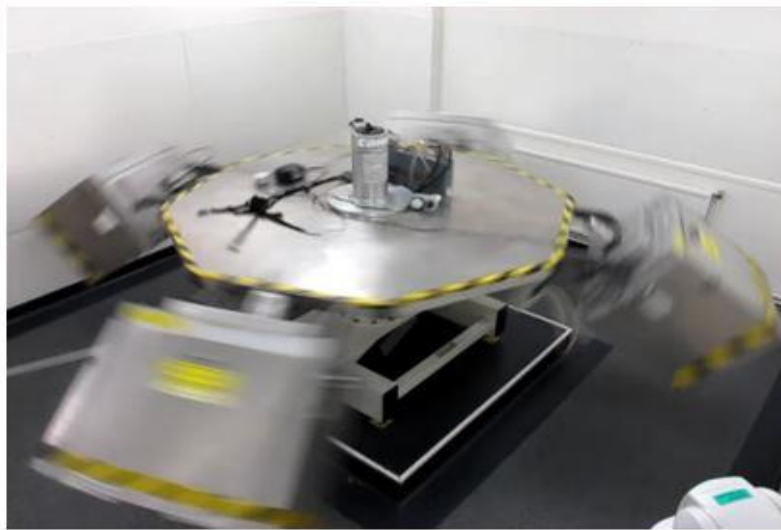


Figure 43 : Photographie de la centrifugeuse (COMAT Aérospace, Flourens, France) située sur la plateforme d'hypergravité (PLEXAN). Rayon 1m40.

Pour notre modèle, nous utilisons une gravité de 2g (vitesse de rotation de 29.6 rotations par minutes) sur une période de 56 jours. Dans chacune des 4 nacelles, 3 cages standards sont installées. Chaque cage comprend 3 ou 4 souris. Les nacelles sont équipées de lampe normale (jour) et infrarouge (nuit) et en surveillance permanente grâce à un système de caméra vidéo. Cela permet de contrôler les ressources en eau et en nourriture, mais aussi le bien-être des animaux. Un cycle circadien de 12 heures est mis en place ainsi qu'un contrôle de température (22°C) et d'hygrométrie (60%). Un arrêt est prévu à la moitié du temps afin de recharger de l'eau et de la nourriture et de changer les litières. Deux autres arrêts sont effectués 7 et 2 jours avant la fin du protocole pour permettre de faire une injection de tétracycline (250 µL) aux animaux. L'arrêt ne dépasse jamais les 10 min.

En parallèle des souris contrôles sont mises dans des nacelles hors centrifugeuse pour mimer l'environnement de la salle du plateau d'hypergravité.

B. Vibrations corps entier

La moitié des animaux du protocole obèse est soumise à des vibrations corps entier. Ces vibrations débutent après 4 semaines de protocole et se terminent à la mise à mort de l'animal. L'intensité et la fréquence des vibrations sont définies grâce à des études précédentes faites au laboratoire [259], [260]. La fréquence de vibration choisie est de 90Hz et l'intensité est de 0,5g (peak to peak). Un accéléromètre est disposé sous le plateau vibrant afin de vérifier ces paramètres. Les animaux sont placés sur les pots vibrants (sans leur cage) par groupes de 3 ou 4 (ce qui représente une cage). Les vibrations sont faites 5 jours/7 pendant



Figure 44 : Photographie de l'installation du système de vibration corps entiers. Diamètre plateau des pots vibrants 30cm.

4 semaines à raison de 15 min par jour par animal. Les vibrations sont faites durant la phase d'activité des animaux (période de nuit). Une lampe inactinique est placée dans la pièce afin de surveiller les animaux. La lumière rouge ne gêne pas les animaux dans leur cycle circadien. Les souris obèses et obèses OA non vibrées sont placées elles aussi sur des plots vibrants, mais ceux-ci ne sont pas actifs. Les animaux sont sacrifiés quelques heures après la fin du protocole de vibrations afin de leur laisser le temps de retrouver des valeurs de base [Figure 44].

C. Test de tolérance au glucose

Des tests de tolérance au glucose et de dosage d'insuline sont réalisés, un au début et un à la fin du protocole. Pour cela, les souris sont mises à jeun (sauf pour l'eau) 12h avant le test et cela durant leur période d'activité. Lors du test, les souris sont mises en cage individuelle. Pour étudier la réponse à l'injection de glucose, une cinétique est faite. La première mesure est à T0 (avant injection de glucose). Pour cela, le bout de la queue de l'animal est sectionné afin de récolter une goutte de sang pour mesure immédiate de la glycémie grâce à l'ACCU-CHECK Performa (lecteur de glycémie), 30 µl de sang sont aussi récupérés pour doser l'insuline. Une solution de glucose à 20% (10 ml de NaOH 0.9% + 2g de D-glucose (Sigma-Aldrich)) est injectée aux souris par voie intrapéritonéale. Les mesures de la glycémie sont faites tous les 20 min pendant 100 min puis une dernière mesure est prise au temps final, soit 180 min.

Pour le dosage de l'insuline, le sang est récupéré dans des tubes de 200µL héparinés au temps T0, 20, 40 et 80 min après le début du protocole. Le sang total est centrifugé 30 min après avoir été récupéré (7000g pendant 10min à 4°C) afin de récupérer uniquement le sérum et doser l'insuline.

Entre chaque prise de sang, un point de compression est fait sur le bout de la queue. La plaie est désinfectée à la fin de l'analyse. Les animaux sont surveillés durant quelques jours après le test afin de vérifier leur bonne santé.

Exploitation des résultats

Les valeurs obtenues par le lecteur de glycémie permettent de tracer la cinétique de captation du glucose sanguin en fonction du temps. Cette courbe sert à déterminer l'aire sous la courbe (AUC). Ce sont donc les AUC qui sont comparées afin de voir les différences entre les animaux. Le dosage de l'insuline se fait par kit EIA (Mouse Insulin Elisa Alpco/Eurobio). Brièvement, sur chaque plaque, une gamme étalon ainsi que 2 contrôles internes sont ajoutés. La courbe étalon est valable uniquement pour la plaque sur laquelle elle est faite. Chaque point est fait en duplicata, 10µL de sérum sont mis par puits + 75µL de Working strength conjugate puis incubé 2h à température ambiante et sous agitation. La procédure est la suivante :

- Rincer 6 fois la plaque avec la solution wash buffer.
- Mettre 100µL de TMB par puits et incubé 15min à température ambiante, sous agitation et à l'obscurité.
- Ajouter la solution stop (100µL),

- Agiter et lire à 450 nm.

Les valeurs obtenues sont converties en concentration (ng/ml) grâce à la courbe étalon ($R^2 > 0.99$). A l'aide des différents temps, une courbe de la cinétique de l'évolution de la concentration d'insuline dans le sang est obtenue. Cela permet de calculer une AUC et de comparer tous les groupes entre eux.

Avec les valeurs à jeun au temps T0 de glucose et de l'insuline sanguine, nous pouvons en déduire l'Homeostasis Model Assessment of Insulin Resistance (HOMA-IR) qui est un score de résistance au glucose et à l'insuline et de fonctionnement des cellules bêta du pancréas grâce à la formule ci-dessous : $(\text{Glucose (mmol/l)} \times \text{Insuline (mU/ml)}) / 22.5$. Plus la valeur est importante plus l'animal est résistant à l'insuline. Chez l'humain le seuil d'insulino-résistance est de 3.

D. Test de fonctionnalité musculaire

Un test de fonctionnalité musculaire est également réalisé sur tous les groupes de souris en début et fin de protocole. Le test réalisé est une version modifiée du test de Kondziela (photos)[261]. Il s'agit de suspendre des souris au-dessous d'une grille à mailles fines placée à 45 cm de hauteur et de mesurer le temps que la souris met avant de chuter. Pour la sécurité des animaux, les chutes sont amorties par un tapis d'essuie-tout. La durée avant la chute est ensuite convertie en points (cf. tableau ci-contre) afin de quantifier la fonctionnalité musculaire.

Tableau 1 : Grilles des scores pour le test de Kondziela modifié.

Temps (en s)	1-10	11-25	26-60	61-90	91-120	121-150	151-180	181-210	211-240	241-270	271-300
Score	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11

Plus le nombre de points est important plus la résistance musculaire est forte. Pour chaque animal, 4 essais sont réalisés à la suite avec 5 min de repos minimum entre chaque. Cependant, il s'agit d'un test sur l'animal entier, les résultats obtenus sont donc sur l'état général de l'animal.

III. Récupération des échantillons

A. Sur des animaux perfusés au sulfate de baryum

Afin de visualiser le réseau vasculaire des animaux, la moitié de ceux-ci est perfusée par une solution de sulfate de baryum (Roche et al [262]). Il s'agit d'un produit de contraste mise au point et couramment utilisé dans notre laboratoire. Il se compose d'un mélange de baryum, de gélatine et de PBS. Après la mise à mort (MAM) de l'animal, une incision ventrale est faite permettant d'accéder aux organes internes. Le diaphragme et les côtes sont coupés afin de libérer le cœur. A l'aide d'un cathéter (BD Insyste ref 381212) nous perfusions le ventricule gauche de l'animal. L'oreillette droite est incisée afin de ne pas créer de surpression dans l'organisme. Afin que la perfusion se fasse au mieux, le temps entre la MAM et le début de la perfusion doit être le plus court possible, et la température du baryum doit être de 60°C afin que la gélatine ne fige pas. Environ 50 ml de solution est perfusé. Pour valider la perfusion, nous avons établi un barème allant de A à D. Les points de validation sont la blancheur de certains tissus (foie, rein, viscères, mais aussi artère et veine saphènes). Plus l'organe est blanc plus la note est proche de A. Une note globale de B est nécessaire pour pouvoir visualiser un système vasculaire complet.

Après la perfusion, l'articulation arrière droite est récupérée et le tissu musculaire est partiellement retiré, puis l'ensemble est fixé au PFA 4% (48h à 4°C). L'articulation est ensuite incluse en résine de méthyl-méthacrylate (MMA) pour l'analyse au nanoCT et en histologie. L'inclusion dans le MMA se compose de plusieurs étapes successives. L'échantillon est tout d'abord déshydraté par bain croissant d'acétone (70, 90 et 100%). Chaque bain dure 3 jours à 4°C. L'échantillon est ensuite imprégné par du MMA et passé sous cloche à vide pour enlever l'air de l'échantillon et faire pénétrer le MMA. Il y a 2 bains de MMA successifs, chaque bain dure 3 jours et se fait au congélateur (-20°C). L'inclusion définitive se fait en ajoutant 320µl d'une solution (1ml de N-N Diméthylaniline + 19 ml de 2-Isopropylalcoyle) accélératrice de polymérisation pour 16ml de MMA et en mettant le tout au frigo (4°C) durant 48h minimum. Une fois l'inclusion terminée, les échantillons sont récupérés. Le MMA est coupé tout autour de l'articulation afin de permettre le passage au nanoCT.

B. Sur des animaux non perfusés au sulfate de baryum

L'autre moitié des animaux n'est pas perfusée. Ils sont MAM par dislocation cervicale, puis décapités afin de récupérer un maximum de sang (entre 400 et 600 µl de sang total). Le sang est récupéré dans des tubes à hémolyse. Après 30 min à température ambiante, ils sont centrifugés 1 min à 13 500 g. Le sérum (100 à 200 µL) est récupéré et mis au congélateur -80°C. Plusieurs tissus sont ensuite prélevés. Tout d'abord, les muscles tibialis (muscle de mouvement) et soléaire (muscle postural), ils sont inclus dans l'OCT. Le principe de l'inclusion est simple, les muscles sont déposés dans une cassette contenant une couche d'OCT. Le muscle est ensuite recouvert par une autre couche de milieu. Il faut éviter les bulles. La cassette est ensuite plongée dans l'azote liquide afin de faire prendre l'OCT et le muscle très rapidement. La cassette est finalement stockée à -80°C. Sont aussi disséqués les muscles gastrocnémiens (muscle de mouvement), les tissus adipeux péri-épididymal, péri-rénal et sous-cutané, les organes internes (foie, rein, rate et cœur). Ils sont mis dans des cryotubes puis plongés dans l'azote liquide et conservés à -80°C. Tous les échantillons récupérés sont pesés individuellement.

La patte arrière droite est prélevée, le tibia est séparé du fémur et de la fibula. Grâce à une lame de scalpel n°11, l'épiphyse tibiale proximale est séparée du reste. Puis la métaphyse est également coupée afin d'obtenir les épiphyses et les métaphyses individuellement. Ces deux échantillons sont mis dans des cryotubes contenant une bille en acier pour le broyage. Les cryotubes sont plongés dans l'azote puis stockés à -80°C.

IV. Analyses des échantillons

A. Des animaux perfusés au sulfate de baryum

1. NanoCT

Les blocs de MMA sont coupés afin de former une baguette entourant l'articulation au plus près, afin que les échantillons puissent être imagés au NanoCT (Nanotom General Electric ; Equipex IVTV, Lyon). Brièvement, un faisceau rayon X (90 kV, 120 µm) est projeté sur l'échantillon. La distance échantillon/détecteur est de 25 cm et entre le faisceau et l'échantillon 1,5cm. La zone d'intérêt est définie comme étant l'articulation, épiphyses et

métaphyses tibiales et épiphyses fémorales, soit en tout un échantillon d'environ 7,2 mm de long. La résolution des images de $3\mu\text{m}$ par voxel. Une pile d'images en XY et XZ est ensuite obtenue. Sur une image, tout ce qui apparaît en blanc représente le sulfate de baryum (haut pouvoir contrastant). L'os quant à lui apparaît en gris et la moelle en noire (non-contrastant).

2. Quantifications numériques sur Image J

La quantification de la porosité corticale moyenne (pourcentage de porosité) et l'épaisseur corticale moyenne se fait par traitement des images avec le logiciel Image J. Sur la pile d'images XY, sont comptées 1000 coupes après l'apparition du tibia. A partir de cette 1000^{ème} coupe (soit environ 3mm en dessous de l'articulation), j'ouvre un stack de 400 coupes (soit 1,2mm). Une fois ouvert, le plugins « os total » est lancé dans Image J, le tableau de données est récupéré. Ensuite le plugins « os cortical » est activé et les résultats sont récupérés aussi. L'ensemble de ces données permet le calcul de l'aire totale de l'os et de la part de la corticale osseuse. Ensuite le plugin « porosité » est lancé, les tableaux de données sont récupérés et donnent l'épaisseur (Ct. Th) et la porosité corticales (Ct.Po).

Sur les images du nanoCT et avec ImageJ, sont aussi quantifiées l'épaisseur du cartilage calcifié et l'épaisseur de l'os sous chondral (quantification réaliser par Damien CLERET).

Ensuite, les analyses des paramètres osseux trabéculaires et vasculaires sont effectuées avec un logiciel nommé CTan (microCT analyse). Pour cela, un stack d'image en XY de 1100 images (la première image débute lors de l'apparition du tibia) est ouvert sur ImageJ. Une première étape consiste à transformer un stack représentant des coupes en sagittal en un stack avec des coupes en frontal grâce au plugin « reslice ». La pile d'images est ensuite ouverte avec CTan. Ce logiciel permet de faire des analyses 2D et 3D. Rapidement, une zone d'intérêt de 250 coupes de profondeur est définie afin de prendre et de conserver le maximum d'information dans la métaphyse. Les intervalles de quantification sont les suivants : tout ce qui est au-dessus de 250 pixels est considéré comme étant osseux et tout ce qui est entre 2 et 249 pixels est vasculaire. Les paramètres quantifiés 2D et 3D pour l'os sont le BV/TV (Bone volume/Total Volume, %), Tb.Th (Trabecular Thickness, μm), Tb.Sp (Trabecular Separation, μm) et le Tb.N (Trabecular Nombre, nombre de travées). Pour les vaisseaux les paramètres 3D et 2D sont le VV/MV (Vascular volume/Marrow Volume, %), V.Th (Vascular Thickness, μm),

V.N (Vascular Number, nombre de vaisseaux), V.Sp (Vascular Separation, μm) ainsi que la densité vasculaire (Nombre de vaisseaux/ mm^2).

3. Histomorphométrie

Une fois passée au nanoCT, les blocs sont retravaillés (coupés et poncés) afin que la face antérieure de l'articulation soit la partie coupée en 1er. Les coupes sont faites en section frontale de l'articulation. Le microtome utilisé est un LEICA SM 2500E avec couteau en carbure de tungstène. Les coupes (9 μm) sont réalisées de façon sériée et effectuées dans la région d'intérêt prédéfinie par des études antérieures. Les coupes sont réparties en 3 groupes :

- Coupe dite blanche, sans coloration afin de visualiser le marquage tétracycline (sur les fronts de minéralisation). Les coupes sont directement mises dans de l'alcool absolu avant d'être montées entre lame et lamelle grâce à l'entellan.
- Coupe avec coloration safranine O (0.067%)/ Fast Green (0.037%) (cartilage calcifié et comptage des adipocytes). Les coupes sont d'abord mises dans la safranine O pendant 10 min puis rincée à l'eau déminéralisée. Elles sont plongées dans le Fast Green durant 5 min, rincées et mises dans l'alcool déshydratation avant montage à l'entellan.
- Coupe pour marquage TRAP « Tartrate-Resistant Acid Phosphatase » avec contre coloration au bleu d'aniline (visualisation des ostéoclastes). Les lames sont mises dans un mélange de solution de naphтол (0.1 mg pour 50 ml) et de Fast violet (0.25 mg pour 50 ml) durant une nuit à 4°C. La réaction est stoppée par 20 min dans une solution de NaF à 4,2% avant d'être contre colorée au bleu d'aniline pendant 30 min. Entre chaque étape, les coupes sont rincées à l'eau distillée. Les coupes sont montées entre lames et lamelle avec du Permount.

Pour les lames safranine O/Fast Green des photos de la métaphyse entière sont faites au microscope Leitz DMRB au grossissement X5. Les images sont ensuite traitées sur le logiciel d'analyse ImageJ grâce aux plugins adipocyte 1 et 2 (cf annexe 2). Sur ces images, les gouttelettes lipidiques (vacuoles blanches) sont comptées et leur nombre est rapporté au volume de moelle de la zone étudiée en soustrayant le volume osseux. Le résultat obtenu permet la quantification d'un nombre de vacuoles lipidiques/mm² de moelle. La zone quantifiée est la métaphyse tibiale [Figure 45].

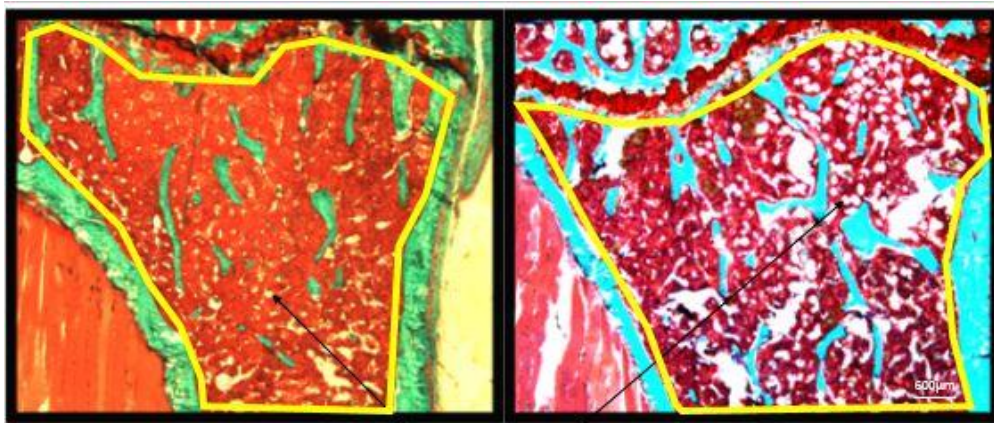


Figure 45 : Quantification des adipocytes métaphysaires.

Métaphyse tibiale avec une coloration safranine O/Fast Green utilisée pour la quantification des adipocytes. A gauche une image du groupe Ctrl et à droite une image du groupe Ob. En jaune est délimité la zone de mesure.

Sur les photos de l'épiphyse, un score OARSI est aussi quantifié. Ce score est un score permettant de quantifier la dégradation du cartilage dans des modèles d'OA. Il va de 1 à 6, avec 6 désignant le grade le plus sévère (cf annexe 3, pour la grille de quantification). Sur ces images est aussi quantifiée l'épaisseur du cartilage articulaire grâce à ImageJ. Ces traitements sont faits par Damien CLERET. Nous utilisons ses résultats.

Pour les lames TRAP, le comptage des ostéoclastes (protocole annexe 4) se fait grâce au microscope Zeiss AX10 et au programme Morphométrie-Résorption. Pour cela, les paramètres osseux (BV/TV et Tb.Th) sont tout d'abord mesurés sur le logiciel Morpho-Expert. Les lames TRAP sont ensuite lues au grossissement x20 et les ostéoclastes sont comptés manuellement sur les 6 champs de la métaphyse (mettre une image de la ROI). Les paramètres ostéoclastiques déterminés sont : le nombre d'ostéoclastes (N.Oc), leur longueur (Oc.Le en µm), leur nombre par surface osseuse (N.Oc/B.Ar en Oc/mm²) et par périmètre osseux (N.Oc/B.Pm en Oc/mm²) et finalement le rapport ostéoclastes/surface osseuse (Oc.S/BS en %).

Sur les lames blanches, les calculs de la minéralisation (protocole annexe 5), se font grâce au microscope Zeiss AX10 et au programme Morphométrie-surface marquées et Morphométrie-épaisseurs-vitesse de minéralisation. Comme pour les lames TRAP, les paramètres osseux (BV/TV et Tb. Th) sont tout d'abord mesurés sur le logiciel Morpho-Expert. Dans un 1er temps sont mesurés manuellement sur toute la métaphyse, les simples et doubles marquages. Les résultats sont en pourcentage des fronts de minéralisations simple (sLS/BS) et double (dLS/BS) par rapport à la surface osseuse totale. Dans un second temps est mesuré manuellement la distance entre les deux traits des doubles marquages. Cela permet d'obtenir la distance moyenne entre les lignes des fronts doubles qui divisée par le nombre de jour entre les deux prises de tétracycline permet la détermination de la vitesse de minéralisation (MAR, $\mu\text{m}/\text{j}$). Ensuite par calcul et avec l'utilisation de la MAR, nous obtenons le taux de formation osseuse (BRF/BS).

B. Sur des animaux non perfusés au sulfate de baryum

1. Coupes et analyses des muscles en OCT

Les blocs d'OCT (cf annexe 6, protocole complet) contenant les muscles sont positionnés de façon à ce que les muscles soléaires (et tibialis) puissent être coupés en section transversale grâce à un cryo-microtome. (Micro HM 560, USA). Le sens de positionnement pour le muscle soléaire est peu important, que l'on commence par l'une ou l'autre des extrémités, il faut toujours atteindre la zone centrale. Pour le muscle tibialis, il faut débiter la coupe du côté du tendon distal et arriver jusqu'à 1/3 du tibialis pour avoir la zone d'intérêt. Les coupes sont de 10 μm . Quatre coupes sont mises sur chacune des lames. Au total, 7 lames sont faites par animal :

- Lame 1 : Coloration Hématoxyline-Eosine (Forme des fibres et noyau)
- Lame 2 : Marquage Immunofluorescent Laminine (Taille et nombre de fibres)
- Lame 3 : Coloration ATPase (Typage de fibre)
- Lame 4 : Coloration Oil Red O (marquage lipidique)
- Lames 5 : Double marquage Immunofluorescent CD31/Laminine (Vascularisation)
- Lames 6 et 7 : Seront stockés en cas de problèmes.

Une fois coupés, les échantillons sont laissés à température ambiante durant 1h avant d'être stockés au congélateur. Une partie des colorations (lame 1 à 3) est réalisée par le laboratoire CARMEN U-1060 (Lyon).

La coloration Oil Red O (solution mère 0,5%) permet le marquage des gouttelettes lipidiques (figure a). La coloration Oil Red O a la particularité de se fixer sur les lipides. Brièvement, les lames sont décongelées et fixées au PFA 4% pendant 20 min avant d'être rincées à l'isopropanol 60%. Les lames sont ensuite séchées durant 45min à température ambiante puis colorées 20 min avec la solution d'Oil Red O (solution fille 60% de la solution mère dans de l'eau déminéralisée). Les lames sont rincées à l'isopropanol 60% puis à l'eau. Elles sont ensuite colorées à l'Hématoxyline durant 5 min et rincées à l'eau. Faire sécher les lames pendant 45 min à température ambiante avant de les monter avec un liquide de montage aqueux (ici Aquamount) [Figure 46a].

L'analyse des échantillons se fait au microscope optique Leitz DMRB au grossissement x20. Huit photos par lames (2/coupes) sont faites et sont analysées par Images J. Une aire (supérieure à 0,08 mm²) est tracée permettant de ne sélectionner que des fibres entières. Le nombre de fibres totales et le nombre de fibres ayant des gouttelettes lipidiques sont comptés manuellement. Le pourcentage de fibre avec gouttelettes est déterminé.

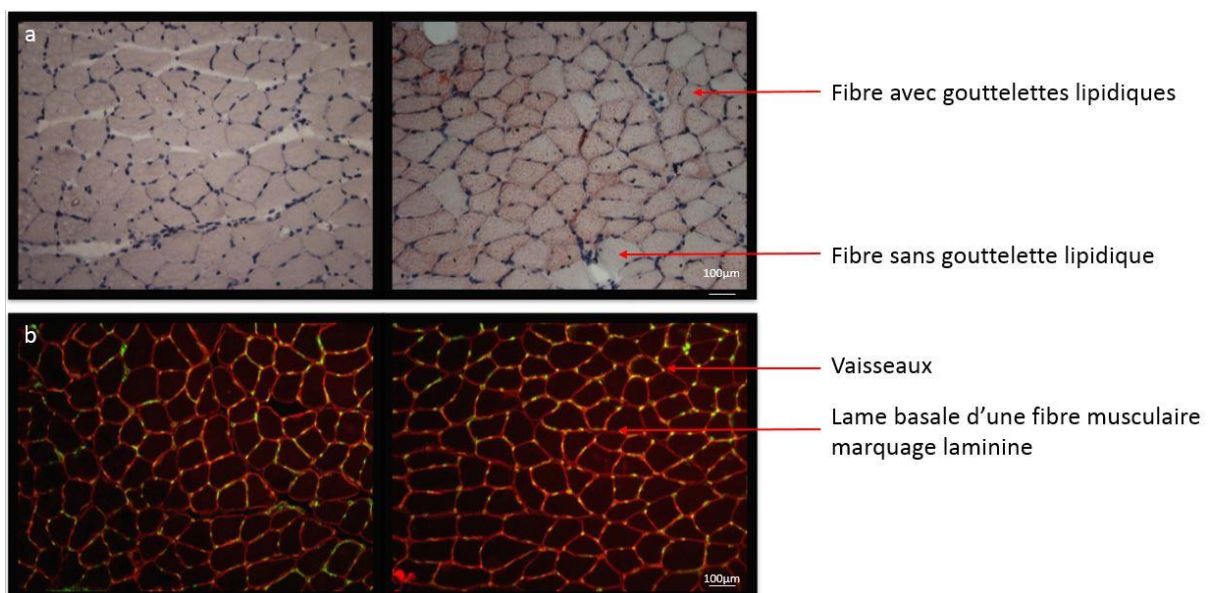


Figure 46 : Quantification sur coupes de muscles soléaires.

(a) Image de muscle après coloration Oil red O (rouge et gouttelettes lipidique) et hématoxyline de Mayers (violet et noyaux). L'image de gauche représente un muscle du groupe Ctrl et à droite un muscle du groupe Ob, (b) Image de muscle après marquage laminine (rouge, membrane basale des fibres) et CD31 (vert, vaisseaux). L'image de gauche représente un muscle du groupe Ctrl et à droite un muscle du groupe Ob

Le double marquage Laminine/CD31 par Immunofluorescence (figure b). Ce marquage met en évidence les cellules endothéliales des vaisseaux qui sont CD31+. La laminine est une protéine de la membrane basale des fibres musculaires et son marquage permet de délimiter les fibres et de situer les vaisseaux. Brièvement, les lames sont décongelées puis recouvertes par une solution de PRM (Solution de Triton 0,3% + PBS) durant 20 min à température ambiante. Ensuite, les lames sont recouvertes d'une solution BAD (PRM 2mL + Sérum de l'anticorps (Ac) secondaire 600µL + PBS 9,4 ml) pendant 30 min. Les Ac primaires sont ensuite dilués (1/100 dans la solution BAD) et ajoutés sur les coupes pour 3h à température ambiante. Trois rinçages de 10 minutes chacun sont effectués avec du PBS sous agitation. Les Ac secondaires sont dilués (1/400) dans la solution BAD et mis en contact des échantillons durant 75 min à l'obscurité et à température ambiante. Les lames sont rincées 3 fois comme précédemment (mais à l'obscurité) puis est ajoutée la solution de DAPI (1/100) avec incubation 10 min à 37°C. Les lames sont enfin montées avec du Vectashield et sellées au vernis [Figure 46b].

L'analyse des échantillons se fait au microscope optique Leitz DMRB au grossissement x20. Huit photos de chaque marquage sont faites par lames (2/coupes) et sont analysées par ImageJ. Les photos des marquages laminine servent à déterminer la zone d'intérêt afin d'avoir uniquement des fibres complètes et de mesurer une aire (mm²). Les images avec marquages CD31 permettent de voir les vaisseaux. Parmi eux ne sont comptés que les vaisseaux qui sont perpendiculaires à la surface de coupes. Ensuite, l'image est binarisée et le nombre de vaisseaux est quantifié. Pour n'avoir que les vaisseaux, nous utilisons un filtre en fonction de leur taille (entre 15 et 250 pixel²). Cela permet ensuite de calculer un nombre de vaisseaux par mm² de muscles et enfin par 200 µm² de tissu.

Les autres marquages et quantifications sont réalisés par la plateforme du laboratoire CARMEN U-1060 (Lyon). Rapidement, la coloration hématoxyline et éosine est faite pour vérifier que les coupes sont bien dans le plan transversal et que les fibres ne sont pas détériorées par le processus de dissection/conservation/coupes. Le marquage laminine permet de quantifier la taille des fibres ainsi que leur nombre dans la section de muscle. En moyenne plus de 2000 fibres sont quantifiées par muscle. Un ratio de Ferret est fait et toutes les fibres avec un ratio inférieur à 0.5 ne sont pas comptées. Un ratio de 0 indique des fibres dans le plan longitudinal et un ratio de 1 des fibres transversales. Le marquage ATPase permet

le typage de fibres. Les fibres de types I ressortiront noires et les fibres de types II blanches. Le pourcentage de chaque type pourra ainsi être connu.

2. Analyses de biologie moléculaire

a) *Broyage, extraction et purification de ARN*

Trois types de tissus sont broyés pour faire de l'extraction et purification d'ARN. Il y a les épiphyses, les métaphyses et les muscles gastrocnémiens. Tous les échantillons sont conservés à -80°C. Durant tout le processus de broyage des échantillons, la chaîne du froid ne doit pas être rompue. Rapidement, les os non flushés (métaphyses et épiphyses) sont mis avec leurs billes dans le Mikro Dismembrator S (Sartorius) afin d'être broyés (15s à 2000 vibrations/min). Immédiatement après 1 ml de Trireagent est ajouté. Pour les muscles, ceux-ci sont mis dans 10 ml de Trireagent et broyés à l'aide d'une tige métallique. Les broyats sont mis au -80 durant au moins 24h ensuite.

L'extraction (protocole détaillé en annexe 7) se fait parallèlement pour les os et les muscles. Brièvement, les broyats sont décongelés puis les différentes phases (ARN, protéiques, ADN génomiques) sont séparées par 20 min de centrifugation en présence de chloroforme. Seule la phase contenant l'ARN est récupérée. Par ajout successif d'isopropanol (+ centrifugation) et d'éthanol 70% (+ centrifugation), un culot d'ARN apparaît. Celui-ci est séché et repris et dissous dans 50 µl d'eau RNase free.

La purification peut se faire à la suite de l'extraction ou bien plus tard si l'ARN est conservé à -80°C. Simplement, la solution d'ARN est passée sur plusieurs colonnes (cf protocole détaillés), qui dans un premier temps permettent d'enlever l'ADN génomique encore présent puis dans un second temps d'isoler l'ARN et le purifier de possibles contaminants. Finalement, l'ARN est repris dans 50 µl d'eau RNase free et conservé.

Afin de vérifier que nos ARN sont bien purifiés, 3 µl de chaque échantillon purifié sont passés à l'Experion (Bio-Rad). Celui-ci va mesurer la présence des ARN 18 et 28S, ainsi que leur ratio 28S/18S (plus le ratio est proche de 2 mieux l'échantillon est propre). En plus, de la présence des pics 18 et 28S, il faut vérifier l'absence d'autres pics pouvant indiquer une contamination par l'ADN. De plus, la machine nous donne un RQI (RNA quality indicator) entre 0 et 9,9 qui nous indique si notre ARN est de bonne qualité. Nous acceptons tous les ARN avec un RQI >

7. L'appareil fait aussi une estimation de la concentration de l'ARN présente dans l'échantillon en ng/ μ L.

b) PCR quantitative

Dans un premier temps, nous voulons connaître la quantité d'ARN présent dans chacun de nos échantillons. Pour cela et grâce à l'estimation de la concentration par l'Expérior, nous avons dilué les échantillons afin d'obtenir des valeurs entre 150 et 400 μ g/mL sur la courbe étalon. Les échantillons avec une concentration estimée inférieure à 100 ng/ μ L ont été dilués au 1/200, ceux entre 100 et 350 ng/ μ L sont dilués au 1/500. Finalement, ceux qui ont une concentration supérieure à 350 sont dilués au 1/800. Les échantillons, ainsi que la gamme étalon sont dilués dans du tampon TE 1X et répartie dans les puits sous 100 μ L. Son ensuite rajouté 100 μ L par puits de Ribogreen. Après 3 min d'incubation, la fluorescence est lue. Grâce à la courbe étalon obtenue, nous pouvons déterminer de façon précise les concentrations d'ARN (en μ g/ μ L) pour chaque échantillon (cf protocole complet en annexe 8).

Avant de faire la PCR en elle-même, il est fait une RT (reverse transcription) afin d'avoir des ADNc. Pour cela et grâce à la quantification faite précédemment avec le Ribogreen, un volume équivalent à 2 μ g d'ARN est déposé dans un eppendorf, auquel est ajouté de l'H₂O Nuclease free water pour compléter le volume à 30 μ L si nécessaire. La solution est ensuite mise à 65°C pendant 5 min pour libérer les brins qui auraient pu s'accrocher entre eux. Puis la solution passe 5 min à 4°C. Dans chaque eppendorf est rajouté 10 μ L de Mix RT (8 μ L de 5x iScript reaction mix + 2 μ L iScript reverse transcriptase). Ce Mix RT a pour but de permettre la transcription de l'ARN en ADNc. L'ensemble est mis dans le thermocycler BioRad, pour le programme de transcription inverse (5min à 25°C puis 30min à 42°C et 5min à 85°C et enfin 4°C). Une fois le cycle terminé, est rajouté dans chaque eppendorf 160 μ L d'H₂O nuclease free water. La concentration de chaque échantillon est donc de 1 μ g/100 μ L. Tout cela est conservé à -20°C en attendant les PCR. En plus des échantillons est fait un témoin RT. A la place des 30 μ L d'H₂O/échantillon, il y a uniquement de l'eau. Ce témoin RT subit lui aussi toutes les étapes et il permettra par la suite de vérifier que l'eau utilisée n'est pas contaminée (cf protocole complet en annexe 9).

Toutes les PCR sont réalisées sur l'appareil BioRad CF96 Real time System (C1000 Thermal Cycler). Rapidement, les échantillons sont dilués afin d'avoir une concentration de 2,5µg/mL (concentration de départ de 10µg/mL). Une gamme étalon est faite avec un pool musculaire (pour l'analyse du gastrocnémien) ou un pool métaphysaire (pour l'analyse des métaphyse). La concentration initiale du pool est de 20µg/mL. Cinq point de dilution sont faits pour la gamme étalon, 10µg, 2.5µg, 0.62µg, 0.15µg et 0.04µg/mL. Une plaque est équivalente à 1 gène. Sur chaque plaque est fait, un témoin RT, la gamme étalon et un contrôle négatif (eau) en plus des échantillons. Dans chaque puits est mis 12 µL de MixPCR (6 µL d'H₂O + 4µL d'enzyme + 1µL d'amorce sens + 1 µL d'amorce anti-sens ou 7µL d'H₂O + 4µL d'enzyme + 0.5 µL d'amorce sens + 0.5 µL d'amorce anti-sens), + 8 µL d'échantillon ou de gamme. La plaque est lue avec l'appareil BioRad CF96. Il existe plusieurs protocoles de plaque (de 40 à 45 cycles à 60°C, 63°C ou 65°C) suivant les amorces utilisées. Les nombres de copies obtenus sont déterminés grâce à la courbe étalon. Les valeurs sont en unité arbitraire. La moyenne du groupe contrôle est donnée comme étant égale à 1 et tous les autres groupes sont rapportés et comparés au groupe contrôle. Ci-dessous les amorces utilisées et les conditions expérimentales :

Tableau 2 : Listes des amorces utilisées pour les PCR osseuses et musculaires

c) Analyses sériques

	Nom	Conditions	Amorce sens	Amorce anti-sens
Gène de ménage	HPRT (nm_013556.2)	45 cycles, 60°C;	tgttgatacaggccagact	caacttgcgctcatcttag
Gènes utilisés pour le muscle	VISFATINE (nm_021524.2)	45 cycles, 63°C	tgtctgtggtcagcgatagc	aggtggcagcaactttagc
	PPARγ2 (nm_001127330)	45 cycles, 63°C	tccgtgatggaagaccactc	ccacagactcggcactcaat
	C/EBPα (nm_007678.3)	40 cycles, 60°C	caagccaggactaggagatt	ccaaggcacaaggttacttc
	MYOSTATINE (nm_010834.3)	45 cycles, 63°C	ggccatgatcttgctgtaac	gcttggtgcacaagatgagt
	ACTIVINE RIIB (nm_007397.3)	45 cycles, 63°C	ggctgctggctagatgactt	aaggcattggctggaagaac
	FAT/CD36 (nm_010834.3)	45 cycles, 63°C	gccaaactattgcgacatga	aaggcattggctggaagaac
	FNDC5	45 cycles, 63°C	acctggaggaggacacagaa	catactggcggcagaagaga
Gènes utilisés dans la métaphyse Gènes utilisés pour l'Os	OCN (nm_007541.2)	45 cycles, 63°C	ctctgacctcacagatgcca	ctggtctgatagctcgtcaca
	RUNX2 (nm_009820.4)	45 cycles, 60°C	ccgggaatgatgagaactac	tgtctgtgccttcttggttc
	SOST (nm_024449.5)	45 cycles, 60°C	tcctcctgagaacaaccagac	tgtcaggaagcgggtgtagtg
	PPARγ2 (nm_001127330.1)	45 cycles, 63°C	tccgtgatggaagaccactc	ccacagactcggcactcaat
	C/EBPα (nm_007678.3)	40 cycles, 60°C	caagccaggactaggagatt	ccaaggcacaaggttacttc
	TNF-α (nm_013693.3)	45 cycles, 63°C	gaactggcagaagaggcact	ggccatagaactgatgagag

Les dosages sériques sont faits sur les sérums issus du sang des animaux non à jeun et mis à mort sans perfusion au sulfate de baryum. Comme décrit précédemment, le sang est centrifugé 30 min après récupération à 13500g pendant 1min sur des tubes héparinés. Le sérum ainsi isolé est congelé immédiatement à -80°C. Nous avons mesuré la concentration de TNF- α sur échantillons purs soit 50 μ L/puit (R&D système, Quantikine HS ELISA MHSTA50), de corticostérone avec une dilution au 1/100 soit 1 μ L/puit (Elabscience Mouse

CORT(corticostérone) Elisa Kit E-EL-MO349), de visfatine avec une dilution au 1/20 soit 4µL/puit (LSBio NAMPT/Visfatine ELISA Kit LS-F4385) et de l'Irisine avec une dilution au 1/10, soit 10µL/puit (LSBio FNDC5/Irisine ELISA Kit LS-F23848). Il s'agit à chaque fois d'une réaction colorimétrique lue grâce à un spectrophotomètre aux longueurs d'onde 405nm, 450nm et 620nm. Seule la valeur à 450nm est utilisée pour les calculs. Chaque plaque Elisa est faite avec sa propre gamme étalon et ses propres contrôles internes. Tous les échantillons sont passés en duplicata. La DO moyenne obtenue permet de calculer la concentration de la protéine grâce à la courbe étalon de la plaque.

Nous dosons également les triglycérides grâce au kit Biolabo Triglycérides Méthode GPO (ref 80019). Rapidement, il s'agit de la méthode de Fossati couplée à la réaction de Trinder. Cela consiste à dégrader les TG pour former (en plusieurs étapes) du Quinonéimine. La réaction donne des résultats linéaires. Ce réactif est rose et permet donc de doser la quantité de TG. La lecture se fait au spectrophotomètre à 500nm. Un seul point étalon (concentration de 2g/L) est fait puis une règle de 3 est appliquée pour connaître la valeur des échantillons. Ici aussi les mesures sont faites en duplicatas.

V. Analyses statistiques

Toutes les analyses statistiques ont été faites à l'aide du logiciel GraphPad prism 7.0. L'ensemble des données est exprimé en moyenne, plus ou moins l'écart type à la moyenne. Avant toute autre chose un test de Shapiro-Wilk est réalisé. Il permet de regarder la normalité de la distribution des valeurs et déterminer si les tests seront paramétriques ou non.

Si la normalité est respectée, les tests utilisés seront paramétriques. Plusieurs cas de figure apparaissent, soit nous comparons 2 groupes pour un même facteur et dans ce cas-là, nous utilisons un test T non apparié bidirectionnel. Soit la comparaison se fait sur plus de 2 groupes ou sur plus de 2 facteurs alors nous utilisons dans ce cas-ci un test ANOVA avec post-hoc de Tukey.

Lorsque nous regardons les relations potentielles entre un ensemble de données, nous effectuons tout d'abord une matrice de corrélation. Si des couples de données semblent fonctionner, nous utilisons le test de Pearson et la modélisation par la régression linéaire pour vérifier la significativité.

Si la normalité n'est pas respectée, nous ferons des tests non-paramétriques. Dans le cas des comparaisons de 2 groupes pour une donnée, nous utilisons le test de Mann-Whitney. Pour des combinaisons plus complexes, plus de 2 groupes ou de 2 facteurs, un test de Kruskal-Wallis est fait, suivi d'un post-hoc de Dunn's.

Nous ferons également des tests ANOVA 2 voies lorsque plus de deux facteurs seront à analyser simultanément. Il s'agira d'une ANOVA 2 voies à mesure non répétées suivie d'un test post-hoc de Sidak en cas de significativité pour le facteur en « colonne » ou en « ligne », mais aussi pour l'interaction entre les deux paramètres mesurés.

Les corrélations entre deux données sont faites en cas de non-normalité par un test de Spearman.

Pour l'ensemble des analyses, nous décidons de placer la significativité de la p valeur à 0,05. Dans les cas des post-hoc de l'ANOVA ou du test de Kruskal Wallis, une p valeur corrigée est utilisée en fonction du N et des degrés de liberté.

Partie 1 : Validation des modèles

En premier lieu, nous voulons valider les modèles d'arthrose et d'obésité que nous utiliserons dans tout le reste de l'étude. Pour cela, nous nous appuyons sur les critères établis par la littérature. A chaque fois nous comparerons le contrôle (Ctrl) représenté par des souris ne subissant aucune modification, au groupe dont nous voulons valider le modèle. C'est-à-dire, le groupe OA pour l'arthrose et le groupe Ob pour l'obésité.

I. Modèle d'arthrose

La déstabilisation du ménisque médial (DMM) a l'avantage d'induire une OA avérée mais encore modérée après 8 semaines, car le cartilage articulaire du côté médial au niveau du tibia est encore présent. C'est à ce niveau que nous effectuons la quantification des scores OARSI [Figure 47].

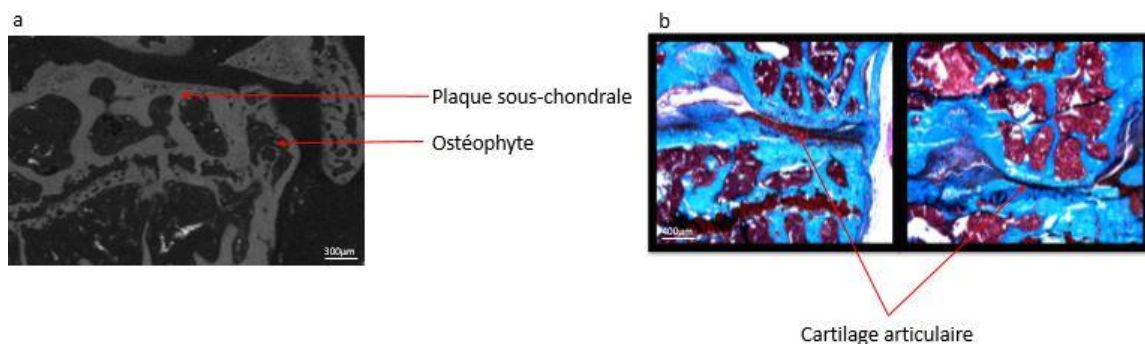


Figure 47 : Quantification des paramètres de l'arthrose.

a) Image microCT permettant la visualisation des ostéophytes et la mesure de l'épaisseur de la plaque sous-chondrale, (voxel 3 µm) (b) Image histologique d'une coloration safranineO/Fast Green permettant la quantification de l'épaisseur du cartilage articulaire interne. L'image de gauche représente le groupe Ctrl et l'image de droite le groupe OA.

Le score OARSI est significativement augmenté dans le groupe OA vs le groupe Ctrl ($3,2 \pm 1.4$ vs 0.15 ± 0.24 , respectivement $p < 0.001$) [Figure 48a]. Neuf animaux sur 10 (90%) du groupe OA présentent un ostéophyte alors qu'aucun n'est mis en évidence pour les animaux du groupe Ctrl [Figure 48b]. Le cartilage articulaire interne du tibia (zone arthrosique), montre une réduction importante de son épaisseur dans le groupe OA ($22.38 \mu\text{m} \pm 6.2$ vs $39.82 \mu\text{m} \pm 5.4$, respectivement, $p < 0,001$) [Figure 48c]. L'épaisseur de la plaque osseuse sous chondrale est augmentée pour le groupe OA ($78.13 \mu\text{m} \pm 12.2$ vs $56.57 \mu\text{m} \pm 11.05$, respectivement, $p < 0.001$) [Figure 48d]. La combinaison de tous ces critères (épaisseur du cartilage articulaire, de la

plaque sous chondrale, de la présence d'ostéophyte et du score OARSI élevé) indique la présence d'une OA modérée et reproductible qui permet de valider notre modèle d'arthrose.

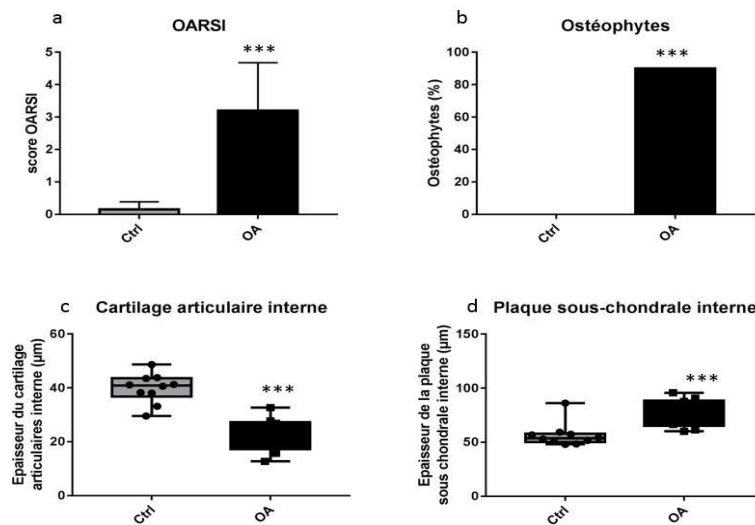


Figure 48 : Caractérisation du modèle d'arthrose sur la partie interne du tibia droit.

(a) Score OARSI, (b) Pourcentage d'ostéophyte, (c) Epaisseur du cartilage articulaire, (d) Epaisseur de la plaque sous chondrale. Les valeurs sont données en moyenne \pm SD. Ctrl n=10, OA n=10. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Test de Mann-Whitney.

II. Modèle d'obésité

Afin de caractériser notre modèle d'obésité, nous devons valider plusieurs critères concernant non seulement la prise de poids mais aussi les différentes composantes du syndrome métabolique et l'augmentation des TA sous cutané et viscéral. Ici nous comparons le groupe Ctrl ayant suivi un régime standard et le groupe Ob avec un régime HFD.

Les résultats montrent une prise de poids supérieure (+48 %) pour le groupe Ob par rapport au groupe Ctrl ($47.2g \pm 6.2$ vs $30.8g \pm 1.7$, respectivement, $p < 0.001$) [Figure 49a]. La prise de poids observée est associée à l'augmentation significative ($p = 0.001$) du TA sous cutané et viscéral. Dans le groupe Ctrl, le TA (viscéral et sous cutané) représente environ 4.5% (1.5 % pour le TA sous cutané et 3 % pour le viscéral) du poids de l'animal alors que dans le groupe Ob, ce même tissu représente plus de 11.5% (4.5 % pour le TA sous cutané et 7 % pour le viscéral) du poids [Figure 49b].

Le groupe Ob présente une augmentation de l'aire sous la courbe (AUC) de la glycémie (73689 mg/dl/min vs 33530 mg/dl/min, $p < 0.001$) et de l'insulinémie (4.44 mg/dl/min vs 1.47 mg/ml/min, $p = 0.007$). Cela est retrouvé au niveau du score HOMA-IR (15.72 vs 2.81 respectivement). Ces trois résultats valident la résistance au glucose, à l'insuline et le développement d'un diabète de type 2 dans le groupe Ob [Figure 49c-e].

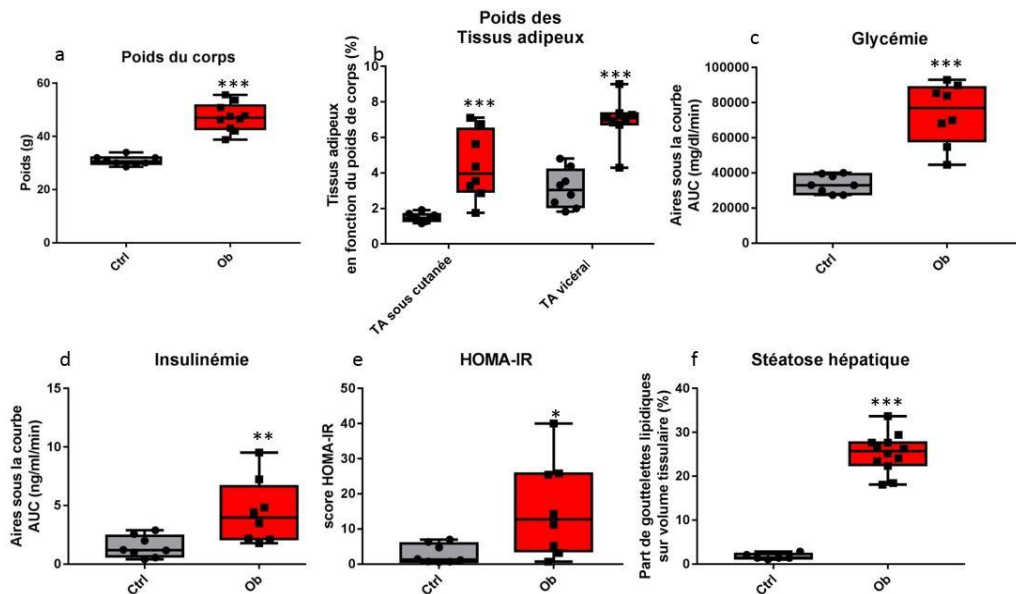


Figure 49 : Caractérisation du modèle d'obésité.

a) Poids de corps, (b) poids des tissus adipeux, (c) mesure de la glycémie, (d) mesure de l'insulinémie, (e) HOMA-IR, (f) Stéatose hépatique. Les valeurs sont données en moyenne \pm SD. Ctrl n=10, Ob n=8. Différence significative avec le groupe Ctrl: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Test de Mann-Whitney.

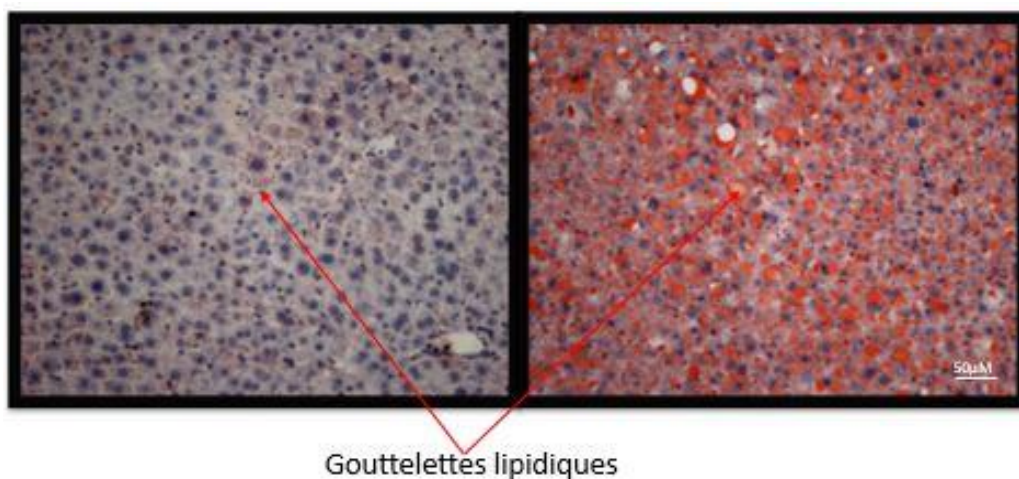


Figure 50 : Quantification des paramètres de la stéatose hépatique.

Image histologique d'une coupe de foie colorée à l'Oil Red O (rouge et gouttelettes lipidiques) et à l'hématoxyline de Mayer (violet et noyaux) permettant la visualisation et quantification du pourcentage de gouttelettes lipidiques. L'image de gauche représente le groupe Ctrl et l'image de droite le groupe Ob.

La stéatose hépatique est présente dans le groupe Ob avec un foie blanchâtre et la présence de gouttelettes lipidiques (environ 25% du tissu). Dans le groupe ctrl seulement 2% du foie contient des gouttelettes lipidiques. Les résultats indiquent clairement que les Ob ont un foie stéatosique [Figure 49f] [Figure 50].

III. Discussion

Les résultats obtenus pour le modèle arthrosique sont en accord avec notre hypothèse « L'induction chirurgicale de l'OA va conduire à une fragilité articulaire ». L'arthrose générée est, comme attendu, de grade modéré avec un cartilage articulaire non totalement dégradé mais plus fragile.

L'utilisation de cette technique chirurgicale permet d'obtenir des résultats reproductibles (écart type faible) et de même intensité (score OARSI identique). De plus, par rapport aux inductions chimiques qui peuvent modifier les communications normales, notre modèle induit un développement proche des arthroses classiquement répandues.

Les caractéristiques de l'OA dans notre étude sont semblables à celles publiées chez des souris de même souches et âge [263]. Nous validons donc notre modèle d'OA qui pourra être discuté au regard de la littérature (thèse de D Cleret).

Pour notre modèle d'obésité, l'hypothèse est là aussi validée, « L'induction de l'obésité par régime HFD va conduire à une modification des paramètres métaboliques généraux ». En effet, la prise de poids et de tissus adipeux ainsi que l'apparition de troubles liés au syndrome métabolique (diabète de type 2, stéatose hépatique) montrent un dérèglement métabolique important dans le groupe Ob.

Le régime HFD est couramment utilisé [264], [265] pour induire les troubles métaboliques liés à l'obésité et ainsi mimer l'évolution de cette maladie. Cependant, nous notons, comme dans [266], une réponse assez hétérogène (très grand écart type). En effet, les animaux comme les humains n'ont pas tous la même réaction envers l'obésité. D'autres techniques d'induction de l'obésité existent, telle que les KO pour la leptine (souris ob/ob) ou son récepteur (db/db). Ces modèles génétiques sont très performants pour induire les troubles métaboliques, mais ils sont moins physiologiques [267], [268].

La présence d'un syndrome métabolique est confirmée s'il y a présence d'au moins 3 des 5 critères : insulino-résistance, stéatose hépatique, TG et glycémie sanguine augmentés et hypertension. Nous confirmons la présence de la résistance à l'insuline et la glycémie augmentée (score HOMA-IR) ainsi que la stéatose hépatique, réunissant ainsi 3 critères majeurs. Par manque de matériel de mesure (pour l'hypertension) et biologique (pour les TG) nous n'avons pas pu faire les quantifications pour ces deux critères. Cependant, nous avons aussi quantifié les poids de corps et des tissus adipeux. Leur augmentation est caractéristique d'une obésité. En définitive bien que tous les critères du syndrome métabolique ne soient pas vérifiés, nous pouvons dire que notre modèle d'obésité est validé et que l'obésité qui en résulte est sévère. Nos souris obèses, après une phase aigüe (2g/semaine) de prise de poids de 6 à 8 semaines se situent dans une phase plus stable où la prise de poids est régulière (0.5 à 1g/semaine).

Nos deux modèles sont donc validés et en accord avec les résultats publiés. Nous pouvons donc nous en servir comme groupe de référence dans l'OA ou dans l'obésité.

Partie 2 : L'obésité pathologique est-elle plus délétère que l'obésité mécanique sur le système musculo-squelettique ?

Les effets de l'obésité MM et M sur le système musculo-squelettique non OA sont évalués. Le groupe Ctrl sera le groupe de référence, les souris obèses M représentent le groupe à 2g et les souris Ob, le groupe obésité MM.

I. Résultats

A. Paramètres métaboliques

Le groupe Ob présente des troubles métaboliques associés à l'obésité qui ne sont pas retrouvés dans les groupes Ctrl et 2g. En effet, la masse corporelle du groupe Ob augmente par rapport au Ctrl (+48%) et 2g (+45%), le pourcentage de gras dans le foie, faible dans les groupes Ctrl (1.7%) et 2g (0.8%), est à plus de 25% dans le groupe Ob. De plus, le score HOMA-IR est lui aussi augmenté chez les souris Ob par rapport aux Ctrl et 2g (17.87 vs 2.82 et 2.90 respectivement). Donc le groupe 2g ne présente aucun trouble métabolique et est comparable au groupe Ctrl sur ces critères [Figure 51a – c].

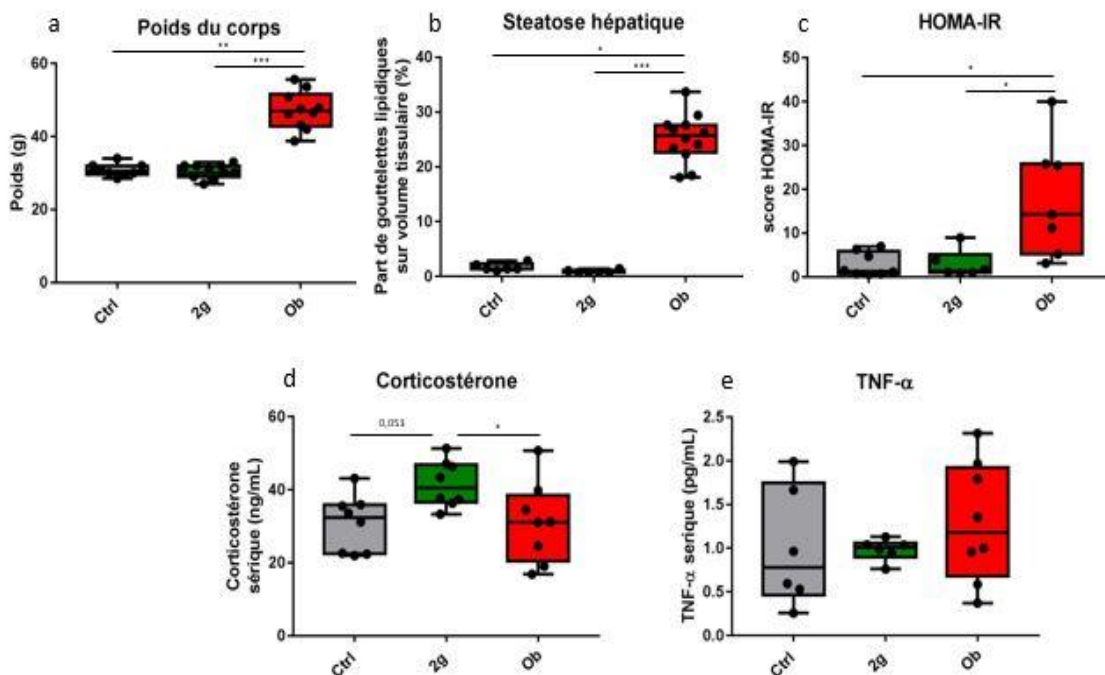


Figure 51 : Caractérisation du modèle métabolique.

(a) Poids du corps, (b) Stéatose hépatique, (c) HOMA-IR, (d) concentration sérique en corticostérone, (e) concentration sérique en TNF- α . Les valeurs sont données en moyenne \pm SD. Ctrl n=8, 2g n=6, Ob n=7. * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001. Test de Kruskal-Wallis.

La corticostérone sérique (hormone de stress) est significativement augmentée chez les 2g par rapport aux Ob (+35%, $p = 0.04$), l'augmentation par rapport aux Ctrl n'atteint pas la significativité ($p = 0.053$) [Figure 51d]. La concentration en TNF- α (inflammation) est la même dans les 3 groupes Ctrl, 2g et Ob [Figure 51e] suggérant que si les animaux Ob sont insulino-résistants, ils ne présentent pas d'état inflammatoire systémique.

B. Paramètres osseux

En ce qui concerne les paramètres trabéculaires osseux des métaphyses tibiales proximales des groupes Ctrl, 2g et Ob, nous n'observons aucune différence. L'obésité MM et M n'influence donc pas ces paramètres [Figure 52a – d].

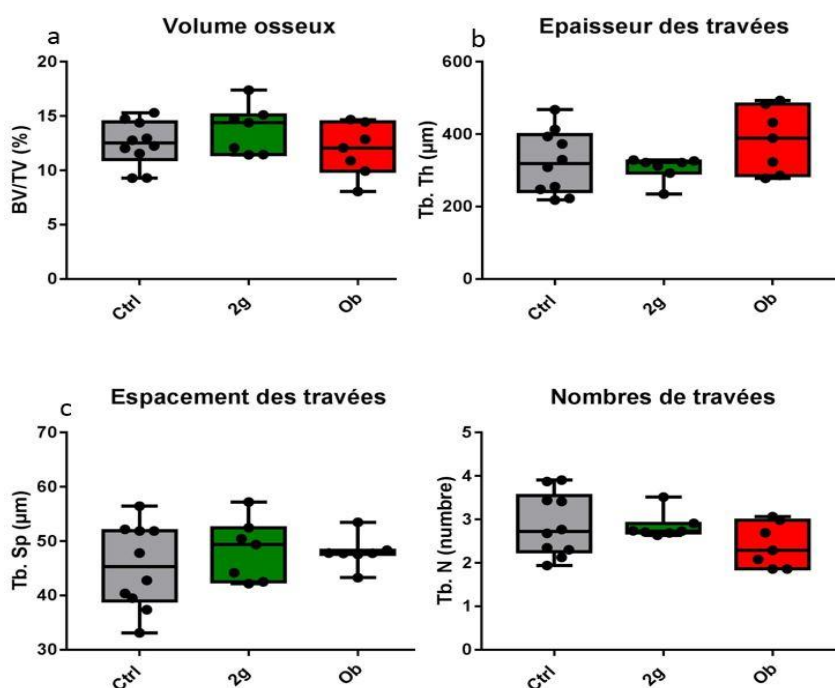


Figure 52 : Paramètres osseux trabéculaires, métaphyse tibiale.

(a) Volume osseux, (b) Epaisseur des travées, (c) Espacement des travées (d) Nombres de travées, Les valeurs sont données en moyenne \pm SD. Ctrl n=10, 2g n=7, Ob n=7. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Test de Kruskal-Wallis. Aucune différence dans ce cas présent.

En revanche, dans cette zone, la densité et le volume vasculaires sont diminués dans les groupes 2g et Ob par rapport au groupe Ctrl (densité vasculaire : -37 % $p = 0.04$ et -70 % $p = 0.0001$, respectivement), cette diminution étant plus sévère chez les Ob que chez les 2g (significatif pour la densité et tendance presque significative pour le volume) [Figure 53a, b, e]. La

densité médullaire adipocytaire est très augmentée dans le groupe Ob par rapport au groupe Ctrl (+420 %, $p = 0.051$) et au groupe 2g (+2178 %, $p = 0.0002$). Aucune différence n'est retrouvée entre le groupe Ctrl et 2g [Figure 53c-d].

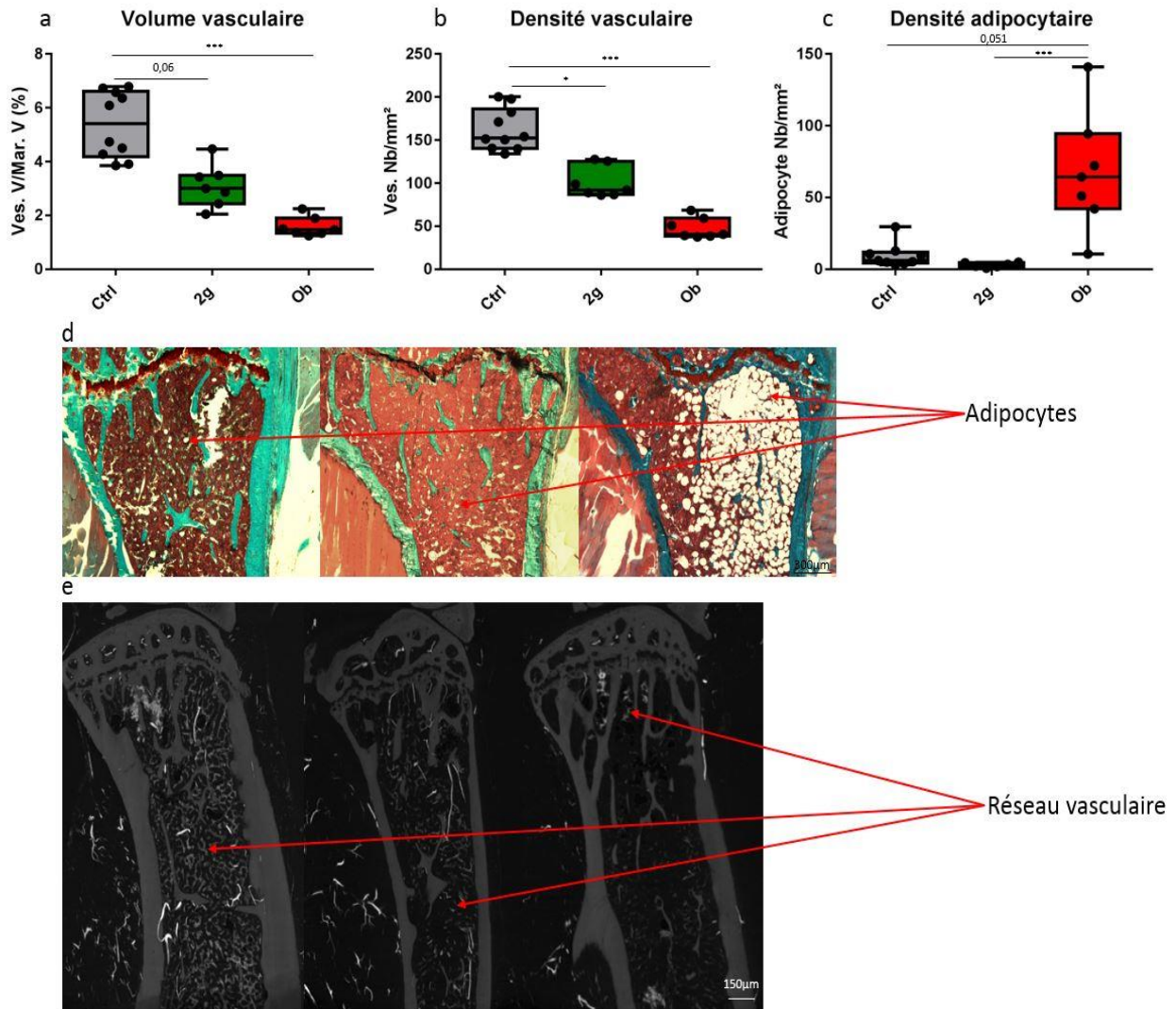


Figure 53 : Paramètres vasculaires et adipocytaires métaphysaires

(a) Volume vasculaire, (b) Densité vasculaire, (c) Densité adipocytaire, (d) coupes histologiques de la métaphyse tibiale (coloration safranine O/Fast Geen) sur coupe de 9 μ m, de gauche a droite, Ctrl, 2g et Ob, (e) image nanoCT du tibia, Z projection, résolution 3 μ m, de gauche a droite, Ctrl, 2g et Ob. Les valeurs sont données en moyenne \pm SD. Ctrl n=10, 2g n=7, Ob n=7. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Test de Kruskal-Wallis.

L'épaisseur de l'os cortical de la diaphyse tibiale est diminuée significativement dans le groupe Ob par rapport aux groupes Ctrl (-8.9 %, $p = 0.012$) et 2g (-8.3 %, $p = 0.037$) [Figure 54a]. La porosité corticale est également diminuée dans le groupe Ob par rapport aux groupes Ctrl (-61.5 %, $p = 0.0005$) et 2g (-57.5 %, $p = 0.02$) [Figure 54b]. Aucune différence n'est retrouvée entre

les Ctrl et 2g. Seule l'obésité MM agit sur les paramètres osseux corticaux suggérant que ce sont les troubles métaboliques qui sont responsables de ces modifications.

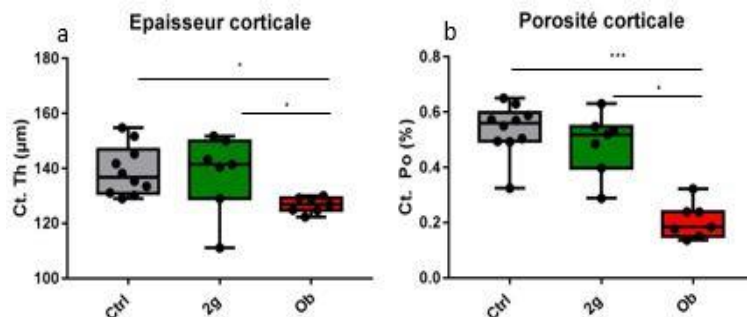


Figure 54 : Paramètres corticaux diaphysaires, Tibia

(a) Epaisseur corticale, (b) Porosité corticale. Les valeurs sont données en moyenne \pm SD. Ctrl n=10, 2g n=7, Ob n=7. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Test de Kruskal-Wallis.

Les surfaces de résorption actives (Oc.S/BS) au niveau de la métaphyse tibiale ne diffèrent pas entre les groupes Ctrl, 2g et Ob ($p = 0.79$) [Figure 55a]. La vitesse de minéralisation (MAR) est la même entre les 3 groupes ($p = 0.9$). En revanche, le taux de formation osseuse (BFR/BS) est diminué dans le groupe Ob par rapport au groupe 2g (-42 %, $p = 0.016$). Les groupes Ctrl et 2g et Ctrl et Ob ne sont pas différents l'un de l'autre [Figure 55b].

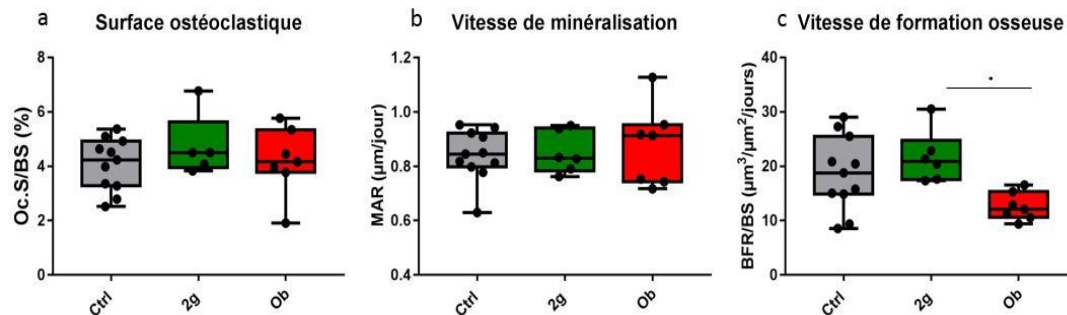


Figure 55 : Paramètres de résorption et de formation osseuses dans la métaphyse tibiale

(a) Surface ostéoclastique, (b) Vitesse de minéralisation, (c) Vitesse de formation osseuse. Les valeurs sont données en moyenne \pm SD. Ctrl n=10, 2g n=7, Ob n=7. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Test de Kruskal-Wallis.

Au niveau moléculaire, dans la métaphyse tibiale, Runx2, un facteur de transcription nécessaire à la différenciation des ostéoblastes, ne varie pas entre les groupes Ctrl, 2g et Ob ($p = 0.94$). Le même résultat est retrouvé pour l'expression d'un marqueur ostéocytaire, SOST, ($p = 0.37$) [Figure 56a, b]. Toutefois, l'expression de l'OCN est diminuée dans le groupe 2g (-71 %, $p = 0.02$). Elle est diminuée aussi chez les Ob mais de manière non significative (-63 %, $p = 0.08$). L'expression de l'OCN est la même entre les groupes 2g et Ob [Figure 56c]. L'expression du TNF- α , facteur qui augmente en cas d'inflammation, n'est pas modulée dans les groupes 2g ($p = 0.9$) et Ob ($p = 0.9$) par rapport au groupe Ctrl [Figure 56d]. Entre les groupes Ctrl, 2g et Ob, les facteurs de différenciation adipocytaire, tels que PPAR- γ ($p = 0.36$) ou C-EBP α ($p = 0.93$) ne varient pas [Figure 56e, f].

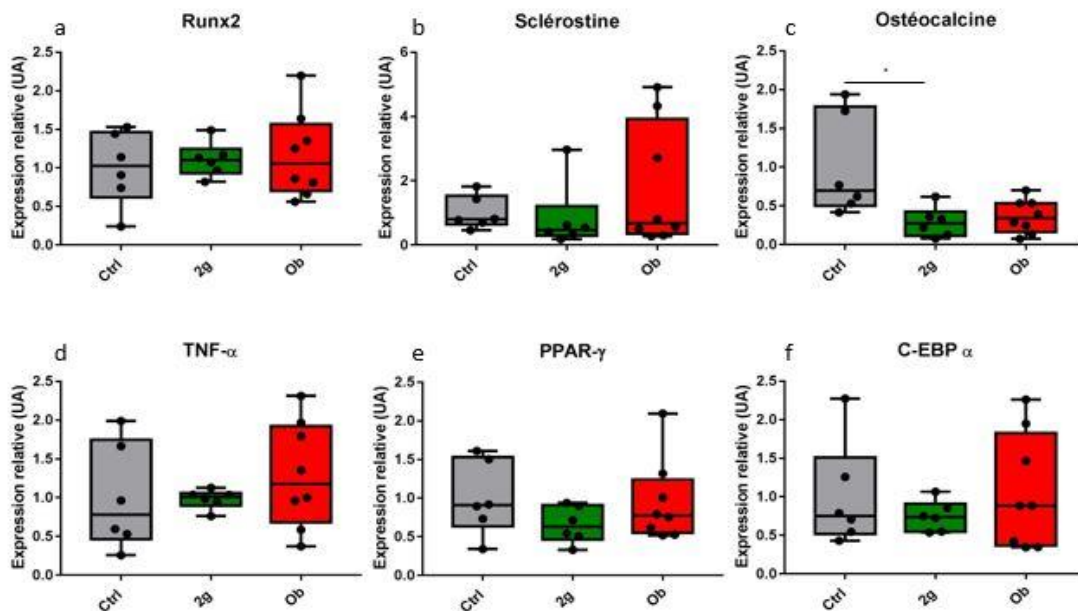


Figure 56 : Expressions géniques dans la métaphyse tibiale droite.

(a) Expression des ARNm de Runx2, (b) Sclérostine, (c) Ostéocalcine, (d) TNF- α , (e) PPAR- γ , (f) C-EBP α . Les valeurs sont données en moyenne \pm SD. Ctrl n=6, 2g n=6, Ob n=8. * $p < 0,05$. Test de Kruskal-Wallis

C. Paramètres musculaires

Les résultats du test de Kondziela (force musculaire globale) montrent une diminution du score pour le groupe Ob par rapport au groupe Ctrl (2 ± 0.54 vs 2.9 ± 0.58 , respectivement, $p = 0.04$). Le groupe 2g n'est pas différent de l'un ou l'autre des groupes, se situant dans une position intermédiaire [Figure 57a].

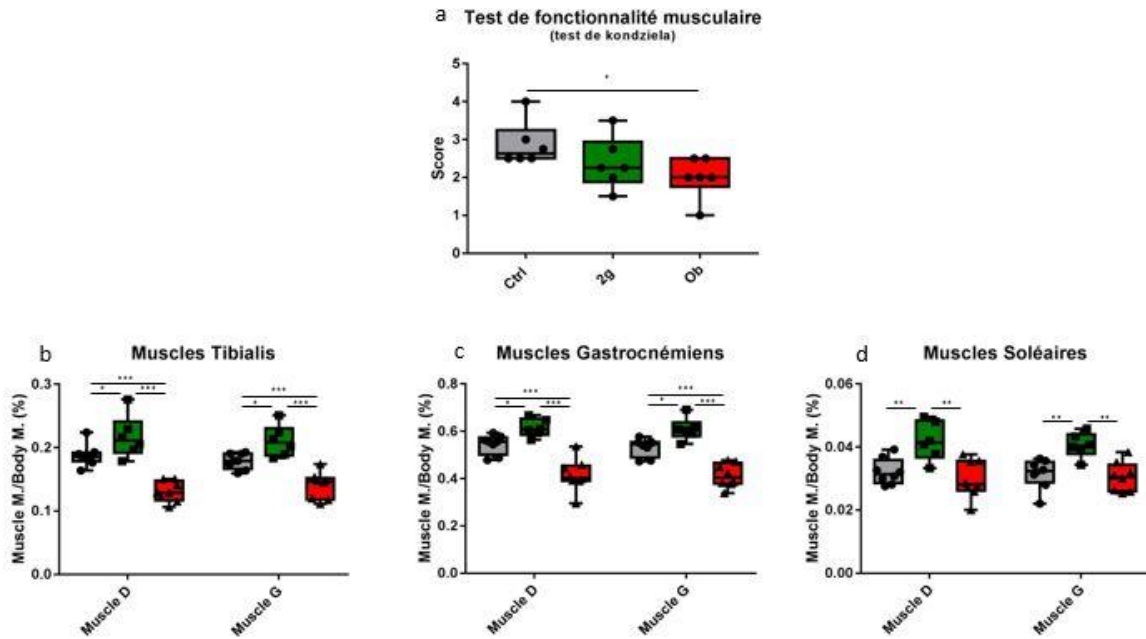


Figure 57 : Paramètres musculaires généraux.

(a) Test de fonctionnalité musculaire globale, (b) Pourcentage de masse des muscles Tibialis, (c) Pourcentage de masse des muscles Gastrocnémiens, (d) Pourcentage de masse des muscles Soléaires, Les valeurs sont données en moyenne \pm SD. Ctrl n=6, 2g n=6, Ob n=8. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Test de Kruskal-Wallis.

Dans tous les groupes, la masse absolue des muscles tibialis, gastrocnémien et soléaire, est la même entre les pattes droites et gauches (non montré). La masse relative du muscle tibialis droit (rapportée à celle du corps) augmente dans le groupe 2g comparé au groupe Ctrl (+14 % de moyenne, $p < 0.03$). A l'opposé, celle du groupe Ob diminue par rapport au groupe Ctrl (-27 % de moyenne, $p < 0.001$) et 2g (-35 % de moyenne, $p < 0.001$) [Figure 57b]. Des résultats similaires sont observés pour la masse relative des muscles gastrocnémiens droit et gauche avec une augmentation chez les 2g par rapport au Ctrl (+23 %, $p < 0.01$) et une diminution chez les Ob par rapport aux Ctrl et aux 2g (-23 % et -31 %, $p < 0.001$, respectivement) [Figure 57c]. En ce qui concerne la masse relative du muscle soléaire, on observe une augmentation chez les 2g par rapport aux Ctrl et aux Ob (+28% et +27 %, $p < 0.001$, respectivement). Aucune différence n'est retrouvée entre les Ctrl et Ob [Figure 57d].

Les fibres musculaires ont été analysées côté droit au niveau du soléaire, muscle postural. Dans ce muscle, la taille moyenne des fibres montre une tendance à l'augmentation chez les 2g par rapport aux Ctrl ($1720 \mu\text{m}^2 \pm 117.7$ vs $1489 \mu\text{m}^2 \pm 158.5$, respectivement, $p = 0.08$). L'augmentation est significative chez les Ob (+21 %, $p = 0.02$, vs Ctrl). Il n'y a aucune différence entre les 2g et les Ob ($p = 0.9$) [Figure 58a]. Le groupe 2g montre plus de fibres de type I (+27.5%, $p = 0.06$) et plutôt moins de fibres de type II (-8%, $p=0.06$) que le groupe Ctrl [Figure 58b]. Le

nombre de fibres musculaires contenant des gouttelettes lipidiques est significativement augmenté chez les Ob (50% des fibres) versus les Ctrl (0.5% des fibres) et les 2g (0.3% des fibres) qui en présentent rarement [Figure 58c].

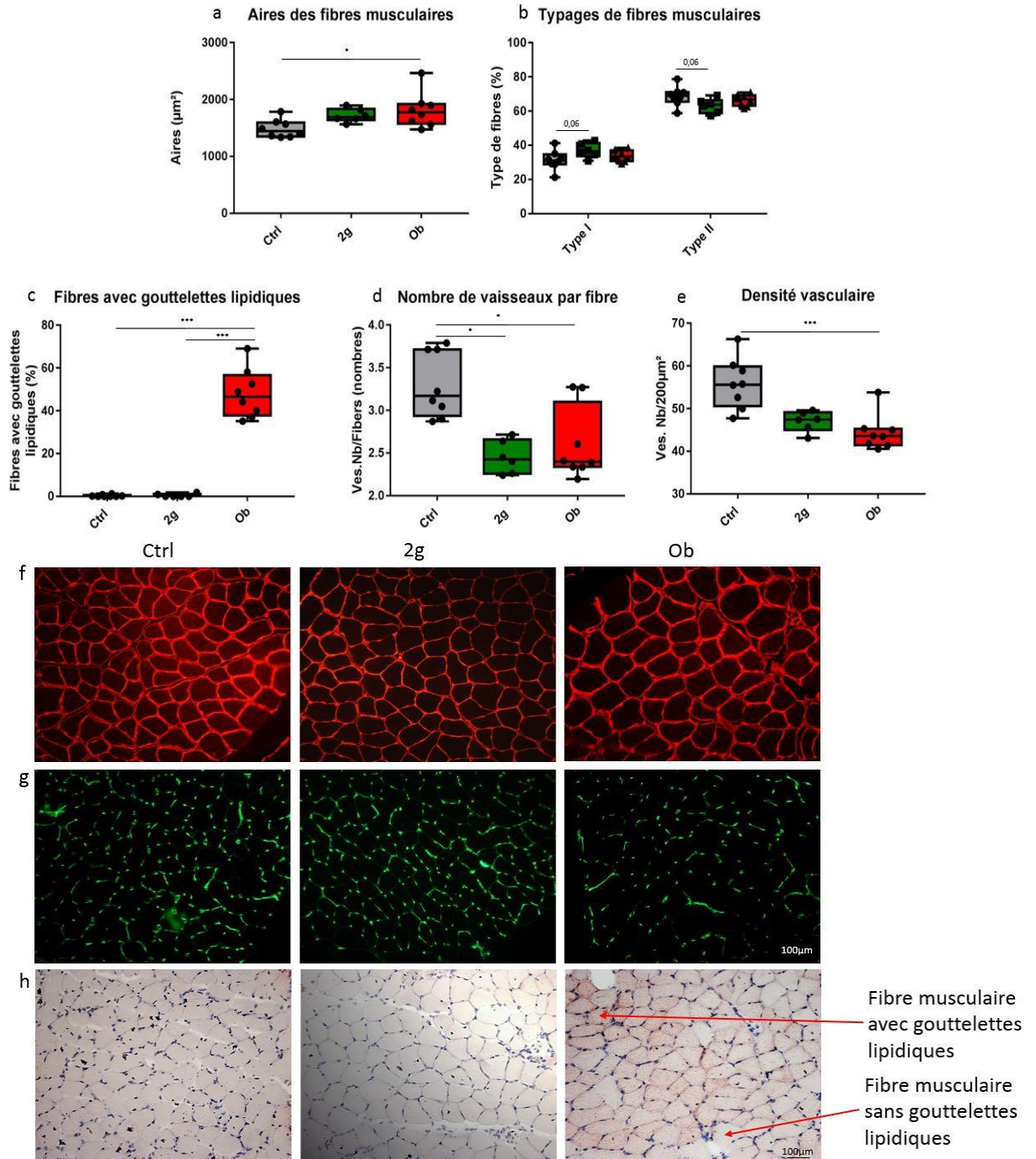


Figure 58 : Paramètres morphologiques du muscle soléaire droit.

(a) Aires des fibres musculaires, (b) Typage de fibres musculaires, (c) Fibres avec gouttelettes lipidiques, (d) Nombre de vaisseaux par fibre, (e) Densité vasculaire, (f) marquage IHC des fibres musculaires par la laminine (rouge) sur coupe (9 μm) de muscle soléaire, de gauche à droite les groupes Ctrl, 2g et Ob, (g) marquage IHC des vaisseaux par le CD31 (vert) sur coupe (9 μm) de muscle soléaire, de gauche à droite les groupes Ctrl, 2g et Ob, (h) coloration Oil Red O des gouttelettes lipidiques dans les fibres musculaires sur coupe (9 μm) de muscle soléaire, de gauche à droite les groupes Ctrl, 2g et Ob. Les valeurs sont données en moyenne \pm SD. Ctrl n=8, 2g n=6, Ob n=8. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Test de Kruskal-Wallis.

La densité vasculaire et le nombre de vaisseaux par fibre du soléaire sont diminués dans le groupe Ob (-20 % p = 0.0009 et -15 %, p = 0.01, respectivement) par rapport aux Ctrl et ne montrent pas de différence avec les 2g. Le nombre de vaisseaux par fibres diminue aussi chez les 2g par rapport au groupe Ctrl (-21%, p = 0.02) [Figure 58d, e].

Les expressions des gènes d'intérêt ont été analysés dans le muscle gastrocnémien droit. On observe des modifications essentiellement dans le groupe 2g. Tout d'abord, l'expression génique de la myostatine et son récepteur Act RIIb est augmentée chez les 2g par rapport aux Ctrl (+102 %, p = 0.006 et +994 %, p = 0.0014, respectivement) et aux Ob (+64 %, p = 0.04 et +600 %, p = 0.019, respectivement), qui eux ne diffèrent pas l'un de l'autre [Figure 59a, b]. Celle de la visfatine suit le même profil : augmentation chez les 2g par rapport aux Ctrl (+196 %, p = 0.0006) et aux Ob (+99 %, p = 0.03) [Figure 59c]. L'expression génique de FNDC5, protéine transmembranaire qui libère l'irisine après clivage, est aussi augmentée chez les 2g par rapport aux Ctrl (+746 %, p = 0.0005) et aux Ob (+334 %, p = 0.037). Les groupes Ctrl et Ob sont similaires sur tous ces paramètres [Figure 59d]. En ce qui concerne les gènes des voies lipidiques, toujours au niveau du gastrocnémien, on observe que PPAR- γ a une expression augmentée chez les Ob par rapport aux Ctrl (+125 %, p = 0.0037), 2g présentant des valeurs intermédiaires et non différentes de l'un ou l'autre. L'expression de C-EBP α , augmente significativement entre chez les 2g et les Ctrl (+827 %, p = 0.0002). Entre les 2g et les Ob l'augmentation observée est non significative. En revanche, les 2g et Ob montrent une

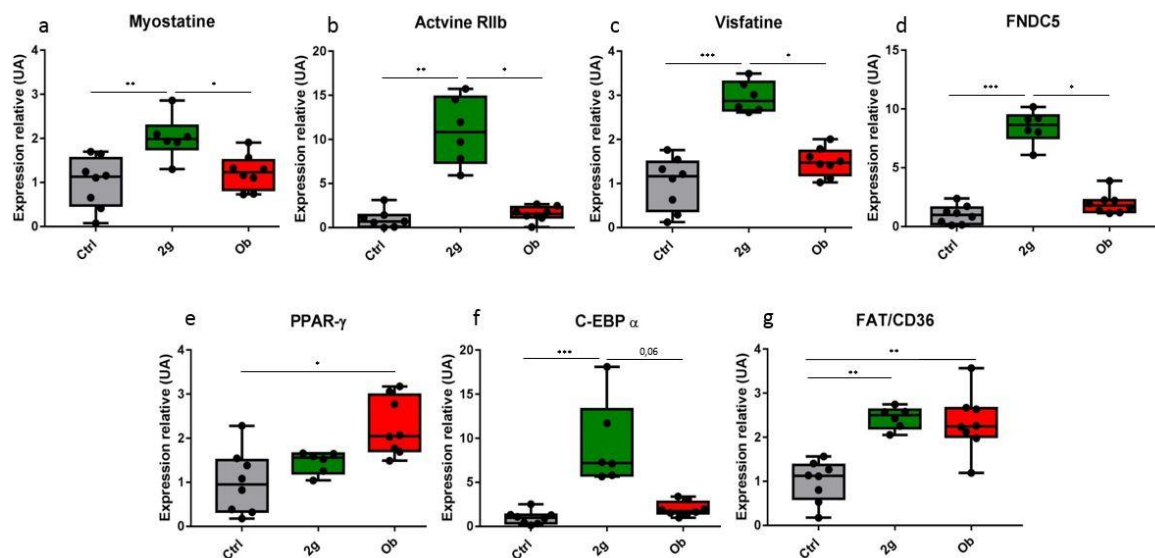


Figure 59 : Expressions géniques dans le muscle gastrocnémien droit.

(a) Expression des ARNm de la Myostatine, (b) de l'ActR1Ib, (c) de la Visfatine, (d) de FNDC5, (e) de PPAR- γ (f) de C-EBP α , (g) de FAT/CD36. Les valeurs sont données en moyenne \pm SD. Ctrl n=8, 2g n=6, Ob n=8. * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001. Test de Kruskal-Wallis.

expression de FAT/CD36 augmentée par rapport aux Ctrl (+143 %, $p = 0.0038$ et +133 %, $p = 0.008$, respectivement) [Figure 59e-f].

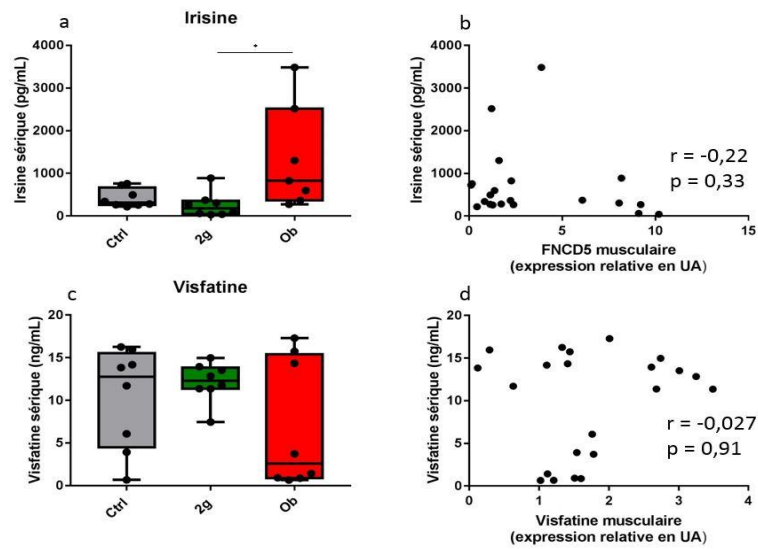


Figure 60 : Concentration sérique en protéines.

(a) Irisine, (b) Corrélation entre l'Irisine sérique et son expression musculaire FNDC5, (c) Visfatine, (d) Corrélation entre la Visfatine sérique et son expression musculaire. Les valeurs sont données en moyenne \pm SD. Ctrl n=8, 2g n=6, Ob n=8. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Test de Kruskal-Wallis.

La concentration sérique en Irisine est augmentée dans le groupe Ob par rapport au groupe 2g (+360%, $p = 0.017$). Les groupes Ctrl et 2g et Ctrl et Ob ne sont pas différents l'un de l'autre. L'expression de FNDC5 dans le muscle et la concentration sérique de l'irisine ($r = -0.22$, $p = 0.33$) ne sont pas corrélés [Figure 60a, b]. Enfin la concentration sérique en visfatine ne diffère pas entre les 3 groupes et nous observons une dispersion assez importante des valeurs dans les groupes Ctrl et Ob. Il n'y a aucune corrélation entre l'expression de la visfatine dans le muscle et sa concentration sérique ($r = 0.27$, $p = 0.9$) [Figure 60c, d].

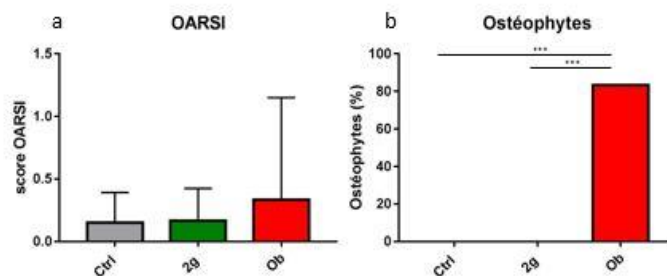


Figure 61 : Caractérisation de l'arthrose.

a) Score OARSI, (b) Pourcentage d'ostéophytes. Les valeurs sont données en moyenne \pm SD. Ctrl n=8, 2g n=8, Ob n=8. *** $p < 0,001$. Test de Kruskal-Wallis.

Alors qu'aucun de ces groupes n'a subi d'arthrose chirurgicale, nous avons vérifié si une arthrose se développait. Le score OARSI reste faible et ne varie pas entre les groupes Ctrl, 2g et Ob (0.15, 0.16 et 0.33, respectivement). En revanche, plus de 80 % des animaux du groupe Ob présente un ostéophyte. Aucun ostéophyte n'est retrouvé dans les groupes Ctrl et 2g [Figure 61a, b].

II. Discussion

L'hypothèse de départ est que l'augmentation de la charge pondérale de l'obésité M pourrait renforcer le système musculo-squelettique contrairement à l'obésité MM qui associe une augmentation de charge pondérale et des troubles métaboliques. Globalement, nos résultats musculaires valident cette hypothèse. En revanche, ça n'est pas le cas pour le squelette qui n'est pas modifié par l'obésité M et qui montre des résultats différents entre les compartiments trabéculaires et corticaux chez les obèses MM. Ceci suggère que ce sont les troubles métaboliques qui sont responsables, en particulier, des modifications de l'os cortical. Dans la littérature, les résultats obtenus chez des souris rendues obèses par l'alimentation sont hétérogènes, montrant parfois une augmentation des paramètres trabéculaires et corticaux [269], [270], associée à une augmentation de l'expression des gènes osseux (Runx2 et SOST). Certaines études montrent une diminution de l'os trabéculaire [271], [272] mais aussi de l'os cortical [273], avec réduction de la formation osseuse (BFR/BS et MAR) associée à une augmentation de la résorption osseuse [265]. D'autres ne montrent aucun changement, ni dans l'os trabéculaire [274], ni dans l'os cortical [272]. Cette hétérogénéité peut s'expliquer par les différents régimes alimentaires (de 15 à plus de 60% de gras, composition différente en sucre et en gras ...), la durée du protocole (phase aiguë ou plus prolongée), le fond génétique des modèles murins, mais aussi par le fait que l'obésité métabolique n'est pas toujours phénotypée.

Dans notre étude chez les Ob, si la microstructure de l'os trabéculaire de la métaphyse tibiale n'est pas affectée, ni l'activité ostéoclastique, on a une diminution probable du nombre d'ostéoblastes actifs (MAR préservée, mais BFR/BS diminué). Les modifications cellulaires que nous observons correspondent probablement à un temps donné dans une cinétique comme décrite chez des souris mâles C57BL/6J obèses [275] qui présentent un pic de résorption à 3

semaines, et une perte osseuse, puis une stimulation de la formation osseuse après 12 semaines. Cette activité cellulaire est à mettre en relation avec l'augmentation des adipocytes médullaires. L'engagement des cellules précurseurs vers la voie adipocytaire aux dépens de la voie ostéoblastique semble donc se produire comme décrit dans [276], [277]. Il serait intéressant de mesurer les propriétés mécaniques de l'os cortical moins épais mais aussi moins poreux. La diminution d'épaisseur est un facteur de fragilité, mais la diminution de sa porosité (résolution 3 μ m) est plutôt vu comme un facteur de renforcement. De manière intéressante, cette porosité est corrélée très significativement à la densité vasculaire médullaire ($r = 0.70$, $p = 0.0001$), ce qui suggère que l'os est moins vascularisé. Un modèle murin obèse et diabétique a récemment révélé une diminution de la porosité vasculaire corticale (résolution 1 μ m) [278]. Un os cortical moins vascularisé sera moins remodelé et donc moins apte à la réparation des microdéfauts, ce qui peut aussi expliquer l'augmentation fracturaire des obèses [279].

Au niveau des facteurs moléculaires, seule l'expression de l'OCN est diminuée dans l'obésité MM. L'ostéocalcine étant produite par les ostéoblastes, la diminution de son expression ferait suite à la baisse de leur nombre. Ces résultats sont en accord avec ceux de l'équipe de Karsenty en particulier [180] et suggèrent que la forme décarboxylée de l'OCN pourrait être diminuée, expliquant la résistance à l'insuline des souris Ob [280] [281]. Notons que l'expression de l'OCN montre aussi une tendance (NS) à la diminution chez les souris 2g mais sans réduction du BFR/BS. Il faudrait compléter ces analyses par des dosages protéiques des formes carboxylées et décarboxylées de l'OCN pour interpréter cette diminution qui, cependant, ne montre pas de répercussion au niveau trabéculaire osseux.

Dans la métaphyse tibiale des obèses MM, les vaisseaux sanguins sont moins nombreux et plus petits, leur capacité d'échange pourrait donc être moindre. Cette réduction n'avait jamais été décrite au niveau osseux. Toutefois, il a été montré que la perfusion osseuse et la conductance vasculaire mesurées *in vivo* à l'aide de microsphères radio-marquées, sont diminuées chez les rats ZDF qui sont obèses et diabétiques [282]. En revanche, les problèmes vasculaires sont bien documentés dans d'autres organes tels que la rétine [23], le tissu cardiaque, le rein ou le tissu adipeux en lien avec la résistance à l'insuline [283] et l'augmentation de l'inflammation [21]. De plus il est bien connu que les réparations

fracturaires des diabétiques sont compromises par défaut de vascularisation au site de cicatrisation[284]. En conclusion, il apparaît nettement que les troubles métaboliques de l'obésité MM, dans l'os, comme dans d'autres organes, altèrent la vascularisation. Au niveau musculaire, l'obésité MM conduit aussi à une diminution de la densité vasculaire et du nombre de vaisseaux par fibre. Cette réduction vasculaire a été décrite chez l'humain dans les années 80. L'étude [285], montre une corrélation négative entre le degré d'obésité et la densité vasculaire dans le muscle. Elle associe aussi la résistance à l'insuline et la vascularisation, montrant que plus la personne est résistante à l'insuline plus sa densité vasculaire ou son nombre de vaisseaux par fibres sera faible. Le phénotype de l'obésité influence la vascularisation générale en diminuant le nombre de vaisseaux dans les tissus.

Dans la littérature, l'hypergravité comme modèle d'obésité mécanique n'a jamais été utilisée. Nos résultats ne montrent aucune implication de l'obésité M au niveau osseux. Chez des souris plus jeunes et exposées à 2g moins longtemps[115] que dans notre étude, une augmentation du BV/TV et de la vascularisation du fémur distal a été rapportée. Cela suggère que les effets de l'hypergravité à 2g sont bénéfiques sur le squelette de souris en croissance mais neutres chez les matures.

On sait que l'obésité MM conduit à une faiblesse musculaire généralisée [286], [287]. C'est en effet ce que nous observons chez les souris Ob qui présentent une baisse de la force musculaire globale et des masses des muscles du mouvement (tibialis et gastrocnémien). Cette faiblesse musculaire s'accompagne d'une augmentation d'IMCL dans les fibres et d'une stimulation de l'expression de FAT/CD36 qui importe les acides gras libres dans la cellule. Cela indique donc que les acides gras sont stockés au lieu d'être consommés. Ce stockage semble expliquer l'augmentation de l'aire des fibres musculaires comme cela a été montré dans le muscle soléaire surtout dans les fibres oxydatives[288] [289].

En parallèle, nous nous attendions à une augmentation de l'expression de la myostatine, de son récepteur Act RIIb ainsi que de la visfatine [290]. Nous pensions également voir une diminution de l'expression de FNDC5. Aucun de ces paramètres n'est modifié chez les souris Ob. L'explication possible peut venir du fait que le temps entre le début du régime et la MAM des animaux est longue, les effets observés sont ainsi déjà installés et les variations

moléculaires qui les ont induits sont passées. Les taux d'expression sont donc revenus à leur état basal. Cependant, nous trouvons une corrélation négative entre le poids final des animaux et l'expression musculaires de visfatine ($r = -0.69$, $p = 0.007$). Cette corrélation n'est pas mise en évidence avec la concentration sérique ce qui corrobore l'absence d'inflammation systémique chez les souris obèses.

L'obésité MM induit une augmentation de PPAR- γ . D'une part, PPAR- γ agit sur les voies d'entrée des lipides (transporteur FAT/CD36), mais aussi sur la résistance à l'insuline et au glucose[291]. Une délétion de PPAR- γ dans le muscle augmente le stockage des lipides dans le corps, la résistance à l'insuline et la stéatose hépatique[292]. D'autre part, PPAR- γ semble aussi avoir un rôle de sensibilisation à l'insuline et l'oxydation des acides gras par l'augmentation de l'adiponectine et autres adipokines dans le muscle[293]. Cependant, PPAR- γ est une molécule qui existe sous 3 isoformes, dont 2 importantes, PPAR- γ 1 (présent dans de nombreux tissus) et PPAR- γ 2 (uniquement dans le tissu adipeux en conditions normales et exprimé dans d'autres tissus sous condition HFD)[294]. Il est évident que suivant le type d'isoforme, les implications ne sont pas les mêmes. Dans notre étude, nous avons dosé les deux isoformes simultanément, nous ne pouvons donc pas savoir si l'une ou l'autre est plus exprimée et si les taux sont différents des Ctrl. De son côté, C-EBP α , n'est pas modifié. Ces résultats ne sont pas ceux attendus, nous pensions observer une augmentation. En effet, nous savons que C-EBP α intervient dans la polarisation des macrophages et le maintien de l'homéostasie énergétique. Une étude a montré qu'une délétion de C-EBP α dans les macrophages musculaires conduit à diminuer la résistance à l'insuline mais aussi l'inflammation lors d'un régime HFD[295]. Sur des cellules 3T3-L1, il a été montré que l'expression de C-EBP α est nécessaire à l'apparition des pré-adipocytes et des adipocytes[296]. Ces résultats pourraient expliquer l'absence de changement dans nos analyses tardives, intervenues après l'installation des adipocytes.

Dans l'obésité M, les masses musculaires sont plus importantes et présentent, dans le soléaire, une augmentation de l'aire des fibres et une tendance à l'augmentation du nombre de fibres de type I, fibres lentes, oxydatives et avec un métabolisme utilisant des acides gras. Le nombre de fibres de type II, n'est pas modifié, voire légèrement diminué. Ces données suggèrent que l'hypergravité stimule les mécanismes oxydatifs des fibres I, augmentant ainsi

la capture des TG circulant par l'augmentation du transporteur FAT/CD36 et des voies lipidiques comme C-EBP α (métabolisme aérobie) et, contrairement à l'obésité MM, ces TG sont rapidement utilisés. Cette demande a sans doute nécessité une production accrue de mitochondries et donc l'augmentation de l'aire des fibres afin de contenir tout le cytoplasme. Comme déjà observé chez des souris soumises à 3g pendant 14 semaines[123], la densité des capillaires sanguins est réduite, probablement en raison d'une augmentation relativement plus grande de l'aire des fibres. De plus nous n'observons pas une augmentation de la force musculaire globale, résultat en accord avec [124]. Dans cette étude, la mesure de la force d'agrippement chez des souris après 3 semaines à 2g, dans des conditions semblables aux nôtres, montre une augmentation de la force au niveau des pattes avant et pas de changement pour les 4 pattes, suggérant une modification de la posture des animaux en hypergravité[124]. Cependant, les modifications musculaires observées chez les 2g présentent des similitudes avec celles qui accompagnent l'exercice en endurance : augmentation de la masse du muscle soléaire[120], augmentation de l'aire et de la formation de fibres de type I [297],[122]. L'étude de Bojados et Jamon [124] conclut également que l'exposition chronique à 2g, et même à 3g, mime les effets de l'exercice en endurance, en revanche une exposition à 4g engendre des effets négatifs.

L'activation du remodelage musculaire chez les souris 2g se traduit par une stimulation à la fois des voies anaboliques (FNDC5) et cataboliques (myostatine, activine RIIb ou visfatine). Notons que ces résultats obtenus dans le muscle gastrocnémien ne sont pas forcément généralisables aux autres muscles, en particulier posturaux comme le soléaire, constamment soumis à une surcharge dans ce modèle[298].

Il se pourrait aussi que la fibre musculaire active ces voies métaboliques en réponse à l'augmentation de corticostérone circulante (hormone de stress induite par l'exercice et par sa durée)[299].

Le système vestibulaire pourrait également jouer un rôle dans les modifications du système musculo-squelettique[300][301]. Dans l'étude de Kawao et al.[300], il est mis en évidence que l'hypergravité modifie le système vestibulaire et par voie de conséquence les paramètres osseux (surtout trabéculaires) et musculaires (muscle soléaire). Des lésions vestibulaires

atténuent les effets de l'hypergravité sur le système musculo-squelettique. Il serait donc important à l'avenir de considérer l'implication du système vestibulaire chez nos souris 2g.

Dans la circulation sanguine, l'irisine n'est pas augmentée avec l'obésité M mais l'est avec l'obésité MM. En général, l'irisine, médiateur des effets métaboliques de l'exercice physique est décrite comme anti-obésité. Cependant les relations entre les niveaux d'irisine plasmatique et les troubles métaboliques liés à l'obésité ne sont pas encore solidement établies [173], [302]. Des niveaux de concentration élevés, comme dans notre étude, ont été rapportés chez des insulino-résistants avec obésité [303]–[306] mais d'autres études, plus nombreuses, montrent le contraire [83], [307]–[311] aussi bien chez l'homme que dans des modèles murins. Si l'irisine est avant tout produite par le muscle squelettique, il a été montré récemment qu'elle est également produite par des adipocytes [170], [171] le cœur et le cerveau [312]. Ainsi en plus d'être reconnue comme une myokine, l'irisine est aussi considérée comme une adipokine, présente dans les tissus adipeux blanc viscéraux et sous cutanés [313]. Cette dernière étude et celle de Yang et al. [303] montrent que lorsque les rats sont rendus obèses, leur tissu adipeux blanc sécrète de manière importante FNDC5, suggérant une forme de résistance à l'irisine. Récemment il a aussi été montré que l'expression de FNDC5 dans l'hypothalamus, le tissu adipeux, le muscle et les niveaux circulants d'irisine sont modifiés par l'alimentation et les changements hormonaux suggérant des régulations centrales et périphériques différentes [314]. Nos résultats ne sont pas en faveur d'une origine musculaire (expression de FNDC5 musculaire inchangée) pour expliquer l'augmentation d'irisine sérique chez les obèses MM. L'analyse des tissus adipeux permettrait peut-être de déterminer l'origine de l'irisine circulante et de mettre en avant le rôle majeur du tissu gras dans sa production chez les obèses MM. Notons que l'expression du FNDC5 musculaire est augmentée chez les obèses M, reflétant bien l'augmentation de l'activité musculaire comme dans l'exercice physique, surtout en résistance [315], [316]. Cependant cette augmentation n'est pas retrouvée au niveau sérique.

Enfin nous observons que l'obésité MM (et pas M) déclenche un développement d'OA avec apparition d'ostéophytes, comme cela a été montré mais chez des souris plus âgées [317]. En effet dans cette étude, l'obésité métabolique, par la sécrétion d'adipokines (et en particulier de la leptine) est impliquée dans les mécanismes d'apparition d'une OA. L'apparition de l'OA

se fait spontanément mais après une très longue période d'obésité (plus de 45 semaines). De plus, nous ne détectons pas de modification du cartilage articulaire entre les 3 groupes. Cependant, nous savons que l'apparition de l'OA et des ostéophytes se caractérise aussi par une érosion du cartilage. Le score OARSI sur coupe de MMA ne permet pas de voir les changements minimes que permettent de voir les coupes en paraffine. Cela peut expliquer le fait que nous ne décelons pas de différences entre nos groupes.

Les investigations osseuses et musculaires ont dû être effectuées chez des souris différentes (souris perfusées au sulfate de baryum pour les études osseuses et non perfusées pour les études musculaires), on ne peut donc pas effectuer des corrélations entre les paramètres osseux et musculaires. Cependant, un schéma se détache. L'obésité MM apparaît comme fragilisant le système musculo-squelettique dans son ensemble alors que l'obésité M influence peu le système osseux, mais renforce le système musculaire sur un modèle d'exercice en endurance. L'impact mécanique seul et l'impact mécanique et métabolique agissent donc différemment, l'un est bénéfique alors que l'autre semble plus néfaste.

Partie 3 : L'arthrose post-traumatique aggrave-t-elle les détériorations musculo-squelettiques dans l'obésité pathologique ou l'obésité mécanique ?

I. Effets de l'OA dans les différents groupes

Dans un premier temps, il faut évaluer les effets de l'OA en tant que tels, ce qui nécessite de comparer les groupes Ctrl versus OA, Ob versus Ob OA (obésité MM) et les groupes 2g versus OA 2g (obésité M). Pour une meilleure compréhension, nous avons décidé de présenter les résultats sous forme de tableaux afin de pouvoir comparer facilement les réponses d'une obésité par rapport à l'autre.

A. Paramètres métaboliques

Les paramètres de l'obésité (masse corporelle, stéatose hépatique et HOMA-IR) ne sont pas différents entre les groupe Ctrl et OA ainsi que les groupes Ob et OA Ob et les groupes 2g et OA 2g [Figure 62a-e].

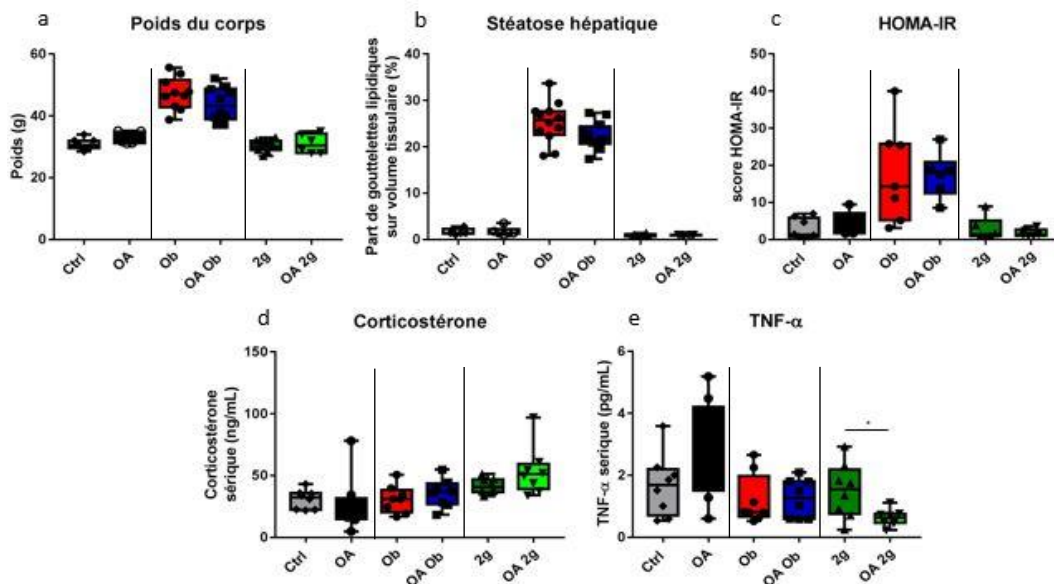


Figure 62 : Caractérisation du modèle métabolique.

(a) Poids du corps, (b) Stéatose hépatique, (c) HOMA-IR, (d) concentration sérique en corticostérone, (e) concentration sérique en TNF- α . Les valeurs sont données en moyenne \pm SD. Ctrl n = 10, OA n = 10, Ob n = 8, OA Ob n = 8, 2g n = 6, OA 2g n = 6. * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001. Test de Mann-Whitney

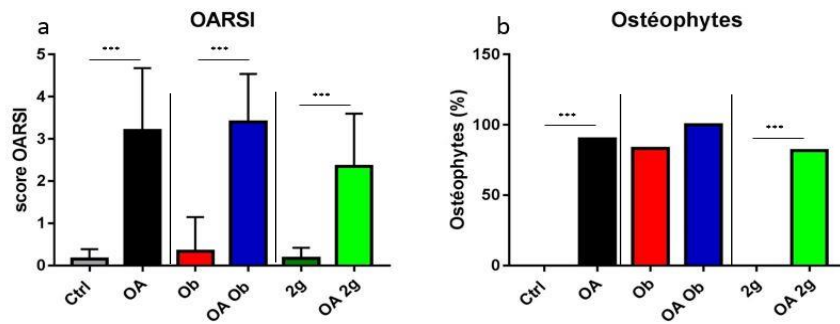


Figure 63 : Caractérisation de l'arthrose.

(a) Score OARSI, (b) Pourcentage d'ostéophytes. Les valeurs sont données en moyenne \pm SD. . Ctrl n = 10, OA n = 10, Ob n = 8, OA Ob n=8, 2g n= 6, OA 2g n=6. * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001. Test de Mann-Whitney.

Les paramètres de sévérité de l'OA montrent un score OARSI significativement plus élevé pour les groupes OA, OA Ob et OA 2g par rapport au groupe Ctrl, Ob et 2g (3.2, 3.4 et 2.35 vs 0.15, 0.33 et 0.16, respectivement). Il n'y a aucune différence entre les groupes OA. Les groupes OA, OA 2g et OA Ob présentent des ostéophytes (environ 90 %), tout comme le groupe Ob (70% des animaux). A contrario, les groupes Ctrl et 2g n'en présentent aucun [Figure 63a, b].

	OA vs Ctrl	OA Ob vs Ob	OA 2g vs 2g
Corticostérone	NS	NS	NS
TNF α	NS	NS	⋮ 58% (p= 0.02)

En grisé les différences significatives, en non grisé, les tendances.

B. Paramètres osseux

Les changements des paramètres osseux sont résumés dans le tableau ci-dessous [Figure 64, 65 et 66].

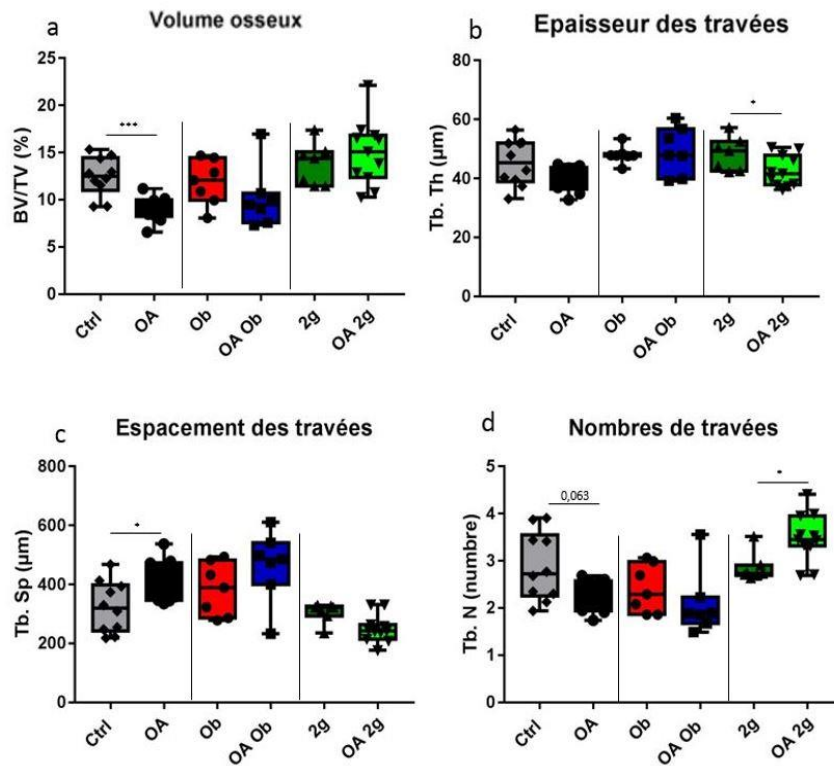


Figure 64 : Paramètres osseux trabéculaires, métaphyse tibiale.

(a) Volume osseux, (b) Epaisseur des travées, (c) Espacement des travées (d) Nombres de travées, Les valeurs sont données en moyenne \pm SD. Ctrl n = 8, OA n = 8, Ob n=7, OA Ob n=7, 2g n = 7, OA 2g n=11. * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001. Test de Mann-Whitney

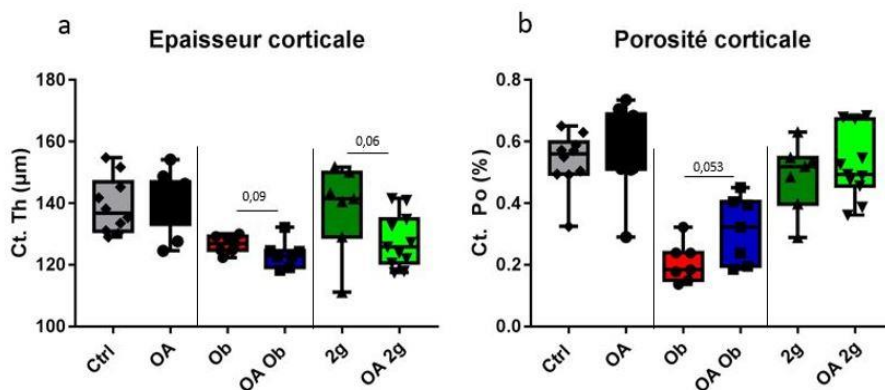


Figure 65 : Paramètres corticaux diaphysaires, Tibia.

(a) Epaisseur corticale, (b) Porosité corticale. Les valeurs sont données en moyenne \pm SD. Ctrl n = 8, OA n = 8, Ob n=7, OA Ob n=7, 2g n = 7, OA 2g n=11. * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001. Test de Mann-Whitney.

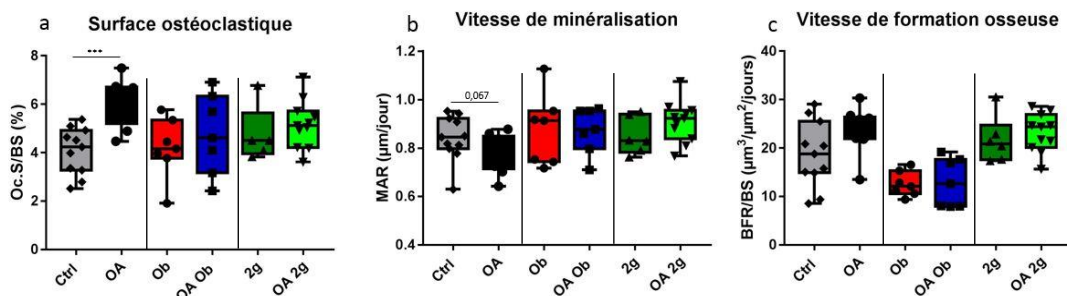


Figure 66 : Paramètres de résorption et de formation osseuses dans la métaphyse tibiale.

(a) Surface ostéoclastique, (b) Vitesse de minéralisation, (c) Vitesse de formation osseuse. Les valeurs sont données en moyenne \pm SD. Ctrl n = 8, OA n = 8, Ob n=7, OA Ob n=7, 2g n= 7, OA 2g n=11. * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001. Test de Mann-Whitney.

	OA vs Ctrl	OA Ob vs Ob	OA 2g vs 2g
BV/TV	↘ 28% (p = 0.0007)	NS	NS
Tb.Th	NS	NS	↘ 11% (p = 0.03)
Tb.Sp	↗ 26% (p = 0.0433)	NS	NS
Tb.N	↘ 21% (p = 0.063)	NS	↗ 22% (p = 0.02)
Ct.Th	NS	↘ 2.6% (p = 0.09)	↘ 7.53% (p = 0.06)
Ct.Po	NS	↗ 51% (p = 0.053)	NS
Oc.S/BS	↗ 48% (p = 0.0008)	NS	NS
MAR	↘ 8.7% (p = 0.067)	NS	NS
BFR/BS	NS	NS	NS

En grisé les différences significatives, en non grisé, les tendances.

Chez les Ctrl, l'OA affecte l'os trabéculaire qui diminue par perte de travées, plutôt que changement de leur épaisseur. Cette perte de travées s'accompagne logiquement d'une stimulation de la résorption ostéoclastique qui, avec une tendance à la diminution de la vitesse de minéralisation, atteste d'un découplage des activités cellulaires osseuses encore visibles 8 semaines après la chirurgie. En revanche, l'os cortical n'est pas affecté par l'OA. Nous pouvons préciser que les modifications observées à 8 semaines se produisent entre 4 (données non montrées) et 8 semaines.

Chez les souris Ob, l'OA affecte uniquement les paramètres corticaux, dans le sens d'une fragilisation (moins épais et plus poreux).

Chez les souris OA 2g, on voit plutôt des effets négatifs vs les 2g non OA caractérisés par une diminution de l'épaisseur corticale et surtout des travées osseuses. Cependant le nombre de travées augmente, ce qui fait que le BV/TV reste stable. Ces changements microstructuraux attestent de modifications d'activités cellulaires osseuses préalables, stabilisées au moment des analyses.

Les changements des paramètres vasculaires, adipocytaires et moléculaires de la métaphyse osseuse sont résumés ci-dessous [Figure 67 et 68].

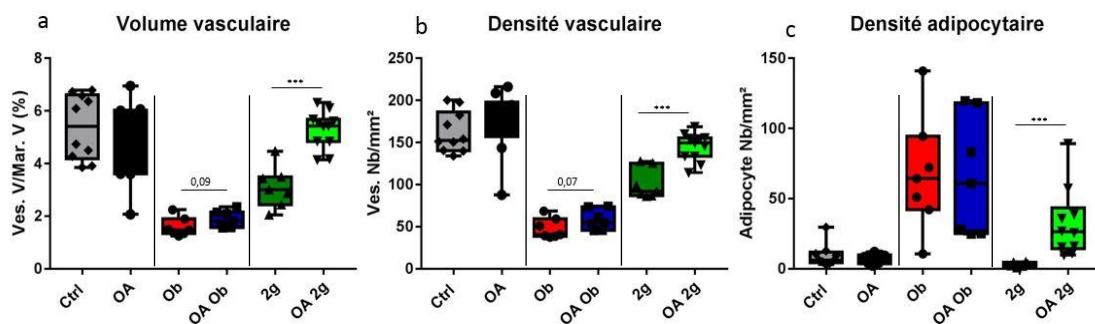


Figure 67 : Paramètres vasculaires et adipocytaires métaphysaires.

(a) Volume vasculaire, (b) Densité vasculaire, (c) Densité adipocytaire. Les valeurs sont données en moyenne \pm SD. Ctrl n = 8, OA n = 8, Ob n = 7, OA Ob n = 7, 2g n = 7, OA 2g n = 11. * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001. Test de Mann-Whitney.

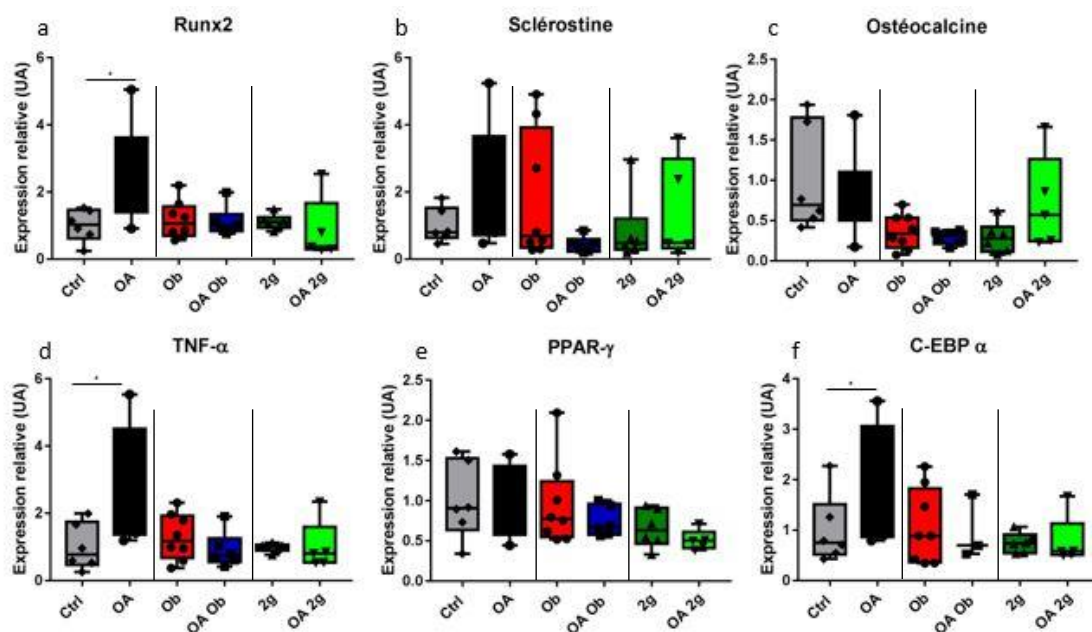


Figure 68 : Expressions géniques dans la métaphyse tibiale droite.

(a) Expression des ARNm de Runx2, (b) Sclérostine, (c) Ostéocalcine, (d) TNF- α , (e) PPAR- γ , (f) C-EBP α . Les valeurs sont données en moyenne \pm SD. Ctrl n = 6, OA n = 6, Ob n = 8, OA Ob n = 6, 2g n = 6, OA 2g n = 6. * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001. Test de Mann-Whitney.

	OA vs Ctrl	OA Ob vs Ob	OA 2g vs 2g
VV.MV	NS	↗ (p = 0.07)	↗ (p = 0.0003)
Densité vasculaire	NS	↗ 19.5% (p = 0.09)	↗ 70% (p = 0.0008)
Densité adipocytaire	NS	NS	↗ 995% (p = 0.0002)
SOST	NS	↘ 75%(p = 0.1)	NS
OCN	NS	NS	NS
Runx2	↗ 149% (p = 0.0152)	NS	NS
PPAR-γ	NS	NS	NS
C EBPα	↗ 98% (p = 0.0411)	NS	NS
TNF-α	↗ 175% (p = 0.0411)	NS	NS

En grisé les différences significatives, en non grisé, les tendances.

L'OA chez les Ctrl n'affecte pas les paramètres vasculaires et adipeux de la moelle des tibias proximaux. Les marqueurs moléculaires Runx2, C EBPα et TNF-α sont augmentés.

Chez les souris Ob, l'OA a peu d'effet mais on observe une tendance à augmenter la vascularisation médullaire (alors que l'Ob la diminue cf partie 2).

Chez les souris 2g, l'OA augmente sensiblement et la vascularisation et la densité adipocytaire sans que cela n'affecte les marqueurs testés et les activités cellulaires osseuses.

C. Paramètres musculaires

Les paramètres musculaires généraux sont résumés dans le tableau ci-dessous [Figure 69].

	OA vs Ctrl	OA Ob vs Ob	OA 2g vs 2g
Test Kondziela	NS	NS	NS
Masse M. soléaire/masse corporelle	NS	NS	NS
Masse M. tibialis/masse corporelle	NS	NS	↘ 8% (p = 0.04)

Masse M. gastrocnémien/masse corporelle	NS	NS	≥ 7% (p = 0.0021)
---	----	----	-------------------

En grisé les différences significatives, en non grisé, les tendances.

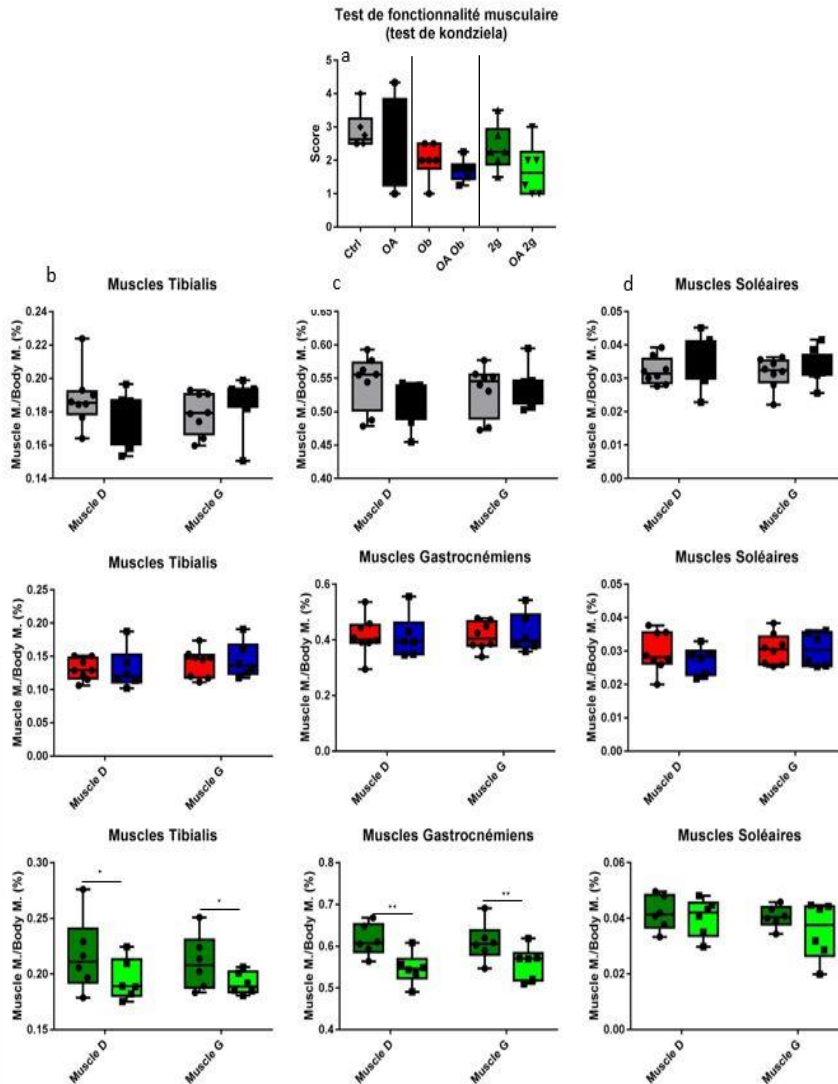


Figure 69 : Paramètres musculaires généraux.

(a) Test de fonctionnalité musculaire globale, (b) Pourcentage de masse des muscles Tibialis, (c) Pourcentage de masse des muscles Gastrocnémiens, (d) Pourcentage de masse des muscles Soléaires, Les valeurs sont données en moyenne \pm SD. Ctrl n=6, OA n=6, Ob n=6, OA Ob n=6, 2g n= 6, OA 2g n=6. * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001. Test de Mann-Whitney pour le test de fonctionnalité musculaire globale et ANOVA 2 voies pour les pourcentage de masse des muscles.

Les paramètres musculaires ne sont pas affectés, sauf dans le groupe OA 2g chez qui les masses des muscles du mouvement diminuent par rapport aux 2g.

Les résultats des analyses sur le muscle soléaire droit sont résumés dans le tableau ci-dessous [Figure 70].

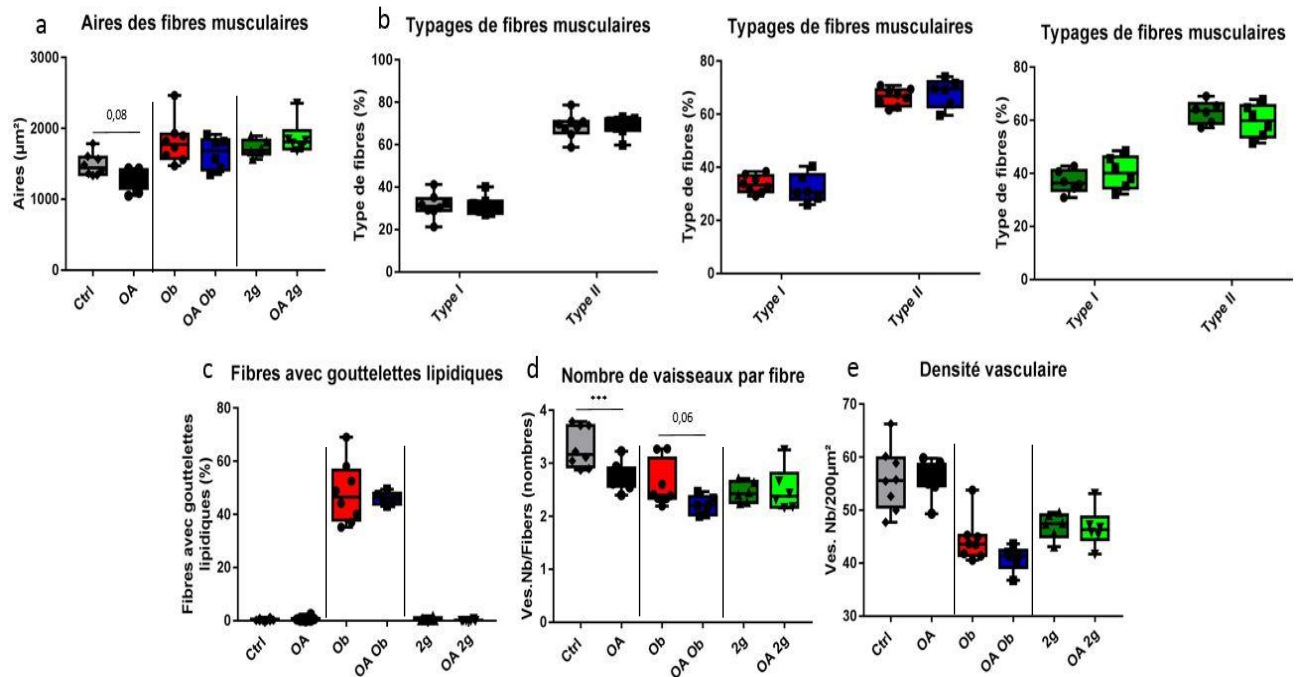


Figure 70 : Paramètres morphologiques du muscle soléaire droit.

(a) Aires des fibres musculaires, (b) Typage de fibres musculaires, (c) Fibres avec gouttelettes lipidiques, (d) Nombre de vaisseaux par fibre, (e) Densité vasculaire. Les valeurs sont données en moyenne \pm SD. Ctrl n=6, OA n=6, Ob n=6, OA Ob n=6, 2g n= 6, OA 2g n=8. * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001. Test de Mann-Whitney.

	OA vs Ctrl	OA Ob vs Ob	OA 2g vs 2g
Aire des fibres	⋮ 12% (p = 0.083)	NS	NS
Typage des fibres	NS	NS	NS
Densité vasculaire	NS	NS	NS
Nombre de vaisseaux par fibre	⋮ 15.9% (p = 0.007)	⋮ 15% (p = 0.06)	NS
% de fibres avec gouttelettes lipidiques	NS	NS	NS

En grisé les différences significatives, en non grisé, les tendances.

Le muscle soléaire présente une tendance à la diminution de l'aire des fibres chez les OA vs Ctrl, chaque fibre étant moins vascularisée. Chez les Ob, l'OA diminue le nombre de vaisseaux par fibre. Chez les 2g, il n'y a pas de changement induit par l'OA, en particulier pas de d'augmentation des gouttelettes lipidiques ou de la vascularisation comme au niveau osseux.

Les résultats des paramètres moléculaires pour les muscles gastrocnémiens droits sont résumés dans le tableau ci-dessous [Figure 71 et 72].

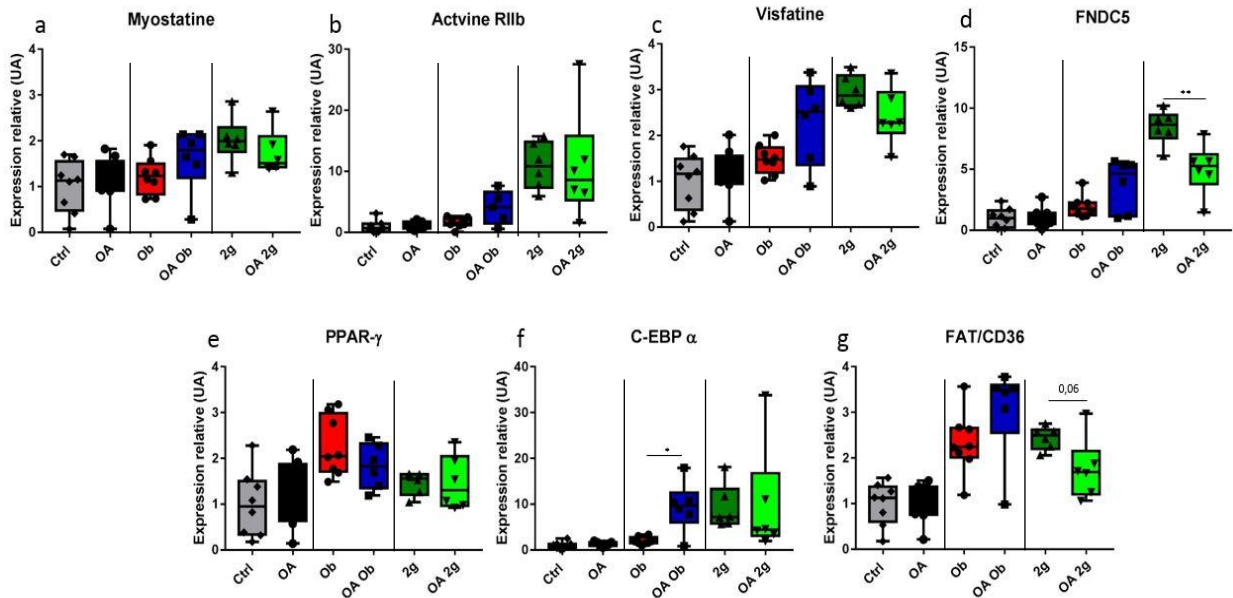


Figure 71 : Expressions géniques dans le muscle gastrocnémien droit.

(a) Expression des ARNm de la Myostatine, (b) de l'Actine RIIb, (c) de la Visfatine, (d) de FNDC5, (e) de PPAR- γ (f) de C-EBP α , (g) de FAT/CD36. Les valeurs sont données en moyenne \pm SD. Ctrl n=6, OA n=6, Ob n=6, OA Ob n=6, 2g n=6, OA 2g n=6. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Test de Mann-Whitney.

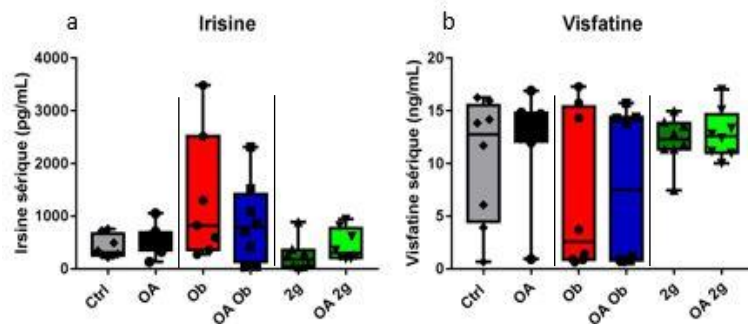


Figure 72 : Concentration sérique en protéines.

(a) Irisine, (b) Visfatine. Les valeurs sont données en moyenne \pm SD. Ob n=6, OA Ob n=6, 2g n=6, OA 2g n=6. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Test de Mann-Whitney.

	OA vs Ctrl	OA Ob vs Ob	OA 2g vs 2g
Myostatine	NS	NS	NS
Act RIIb	NS	NS	NS
FNDC5	NS	NS	↘ 40% ($p = 0.0043$)
Visfatine	NS	NS	NS

PPAR- γ	NS	NS	NS
C-EBP α	NS	↗ 374% (p = 0.04)	NS
FAT/CD36	NS	NS	↘ 28% (p = 0.06)
Visfatine	NS	NS	NS
Irisine	NS	NS	NS

En grisé les différences significatives, en non grisé, les tendances.

L'expression du C-EBP α , marqueur d'adipogénèse, augmente chez les OA Ob vs Ob.

L'expression de FNDC5 diminue dans le gastrocnémien des OA 2g vs 2g suggérant une baisse de la production d'irisine par ce muscle.

II. L'obésité pathologique est-elle plus délétère que l'obésité mécanique sur le système musculo-squelettique de souris OA

Dans cette partie, seules les souris OA sont considérées afin d'évaluer si les effets de l'obésité MM ou M aggravent ou allègent les paramètres liés à l'arthrose. Le groupe OA sera le groupe de référence et sera comparé au groupe OA 2g (obésité M) et au groupe OA Ob (obésité MM).

A. Paramètres métaboliques et arthrosiques

Globalement l'obésité aggrave les troubles métaboliques des souris OA qui ont subi une arthrose post-traumatique. En effet par rapport au groupe OA et OA 2g, le groupe OA Ob présente une masse corporelle (+31 et 44%, respectivement), une stéatose hépatique (22.34% vs 1.77% et 0.98%, respectivement) et un score HOMA-IR (17.87 vs 4.22 et 1.81, respectivement) augmentés. Les groupes OA et OA 2g ne présentent pas de signe d'obésité et ne sont pas différents l'un de l'autre [Figure 73a-c].

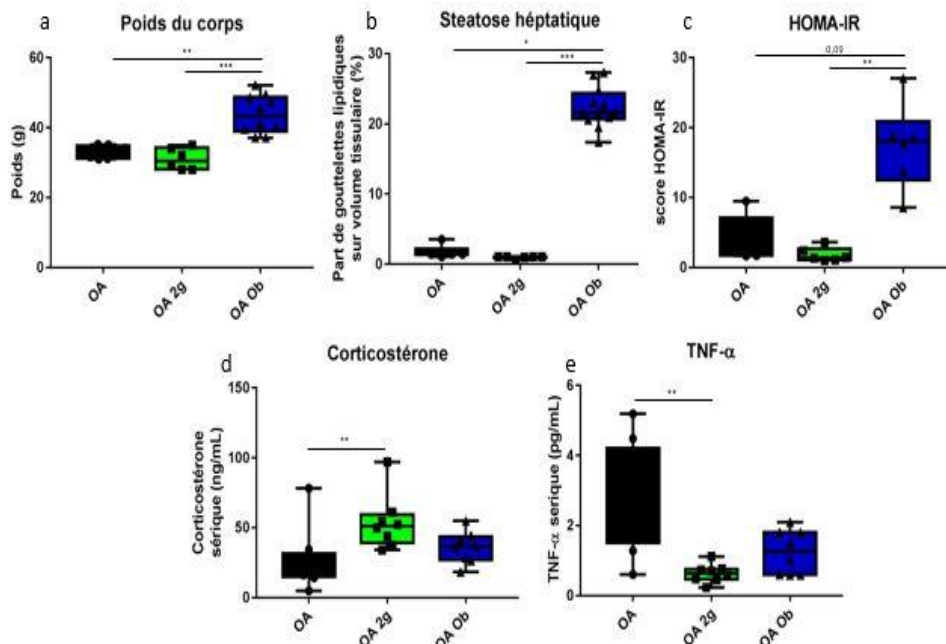


Figure 73 : Caractérisation du modèle métabolique.

(a) Poids du corps, (b) Stéatose hépatique, (c) HOMA-IR, (d) concentration sérique en corticostérone, (e) concentration sérique en TNF- α . Les valeurs sont données en moyenne \pm SD. OA n=8, OA 2g n=6, OA Ob n=8. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Test de Kruskal-Wallis.

Dans le sérum, la corticostérone est augmentée dans le groupe OA 2g par rapport au groupe OA (+102 %, $p = 0.008$). Le groupe OA Ob, elle ne diffère pas des autres groupes. La concentration en TNF- α est diminuée dans le groupe OA 2g par rapport au groupe OA (-76 %, $p = 0.0016$). Le groupe OA Ob présente une concentration intermédiaire aux 2 autres groupes [Figure 73d, e].

Les caractéristiques des animaux arthrosiques sont bien sur les mêmes que décrites précédemment [Figure 74a, b].

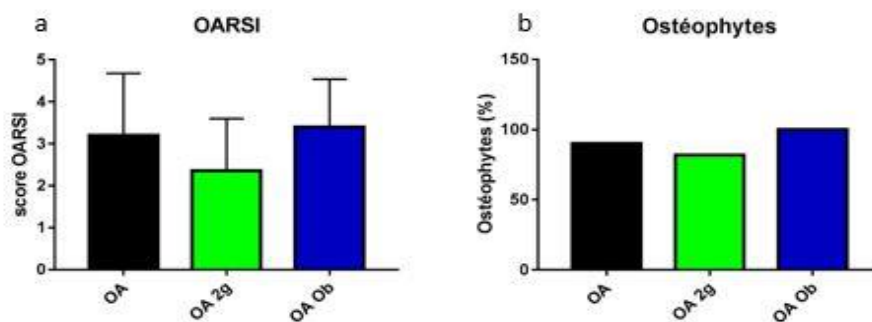


Figure 74 : Caractérisation de l'arthrose.

(a) Score OARSI, (b) Pourcentage d'ostéophytes. Les valeurs sont données en moyenne \pm SD. OA n=10, OA 2g n=10, OA Ob n=7. *** $p < 0,001$. Test de Kruskal-Wallis.

B. Paramètres osseux

Dans la métaphyse tibiale, le BV/TV augmente dans le groupe OA 2g par rapport au groupe OA (+67 %, $p = 0.0006$) et OA Ob (+47 %, $p = 0.02$). Il n'y a pas de variation entre OA Ob et OA [Figure 75a]. Le Tb.Th augmente significativement dans le groupe OA Ob par rapport à OA (+16 %, $p = 0.03$) et ne diffère pas entre les groupes OA 2g et OA [Figure 75b]. L'espacement entre les travées est diminué significativement dans le groupe OA 2g par rapport au groupe OA (-39 %, $p = 0.0035$) et OA Ob (-46 %, $p = 0.0009$) [Figure 75c]. Inversement, le nombre de travées est augmentée dans le groupe OA 2g par rapport au groupe OA (+53 %, $p = 0.0041$) et OA Ob (+67 %, $p = 0.0006$) [Figure 75d].

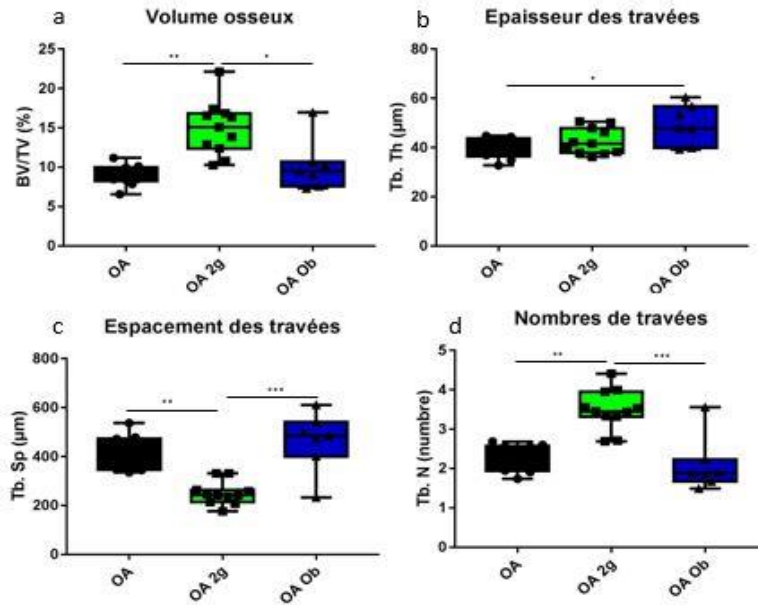


Figure 75 : Paramètres osseux trabéculaires, métaphyse tibiale.

(a) Volume osseux, (b) Epaisseur des travées, (c) Espacement des travées (d) Nombres de travées Les valeurs sont données en moyenne \pm SD. OA n=10, OA 2g n=10, OA Ob n=7. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Test de Kruskal-Wallis.

Dans la cavité médullaire tibiale, il y a une diminution de la densité vasculaire et du VV/MV dans le groupe OA Ob par rapport aux groupes OA (-65 %, $p = 0.0001$ et -60 %, $p = 0.008$, respectivement) et OA 2g (-60%, $p = 0.02$ et -64%, $p = 0.0007$). Les groupes OA et OA 2g ne sont pas différents l'un de l'autre pour ces paramètres [Figure 76a, b]. La densité adipocytaire est augmentée dans les groupes OA 2g (+347 %, $p = 0.0072$) et OA Ob (+801 %, $p = 0.0003$) par rapport au groupe OA et ne diffère pas entre les groupes OA 2g et OA Ob [Figure 76c].

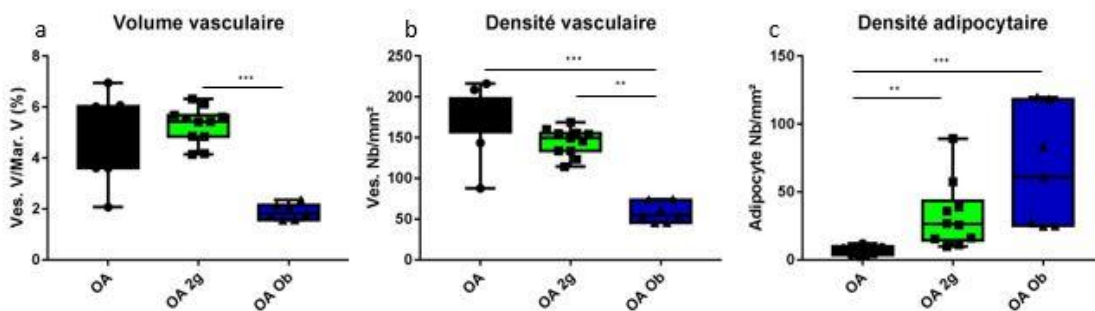


Figure 76 : Paramètres vasculaires et adipocytaires métaphysaires.

(a) Volume vasculaire, (b) Densité vasculaire, (c) Densité adipocytaire, Les valeurs sont données en moyenne \pm SD. OA n=10, OA 2g n=10, OA Ob n=7. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Test de Kruskal-Wallis.

L'épaisseur de l'os cortical diaphysaire du tibia diminue dans le groupe OA 2g (-8.6%, $p = 0.03$) et OA Ob (-11,7 %, $p = 0.004$) rapport au groupe OA. La porosité corticale diminue dans le

groupe OA Ob par rapport au groupe OA (-45 %, $p = 0.017$) et OA 2g (-40 %, $p = 0.02$) et ne diffère pas entre les groupes OA et OA 2g [Figure 77a, b].

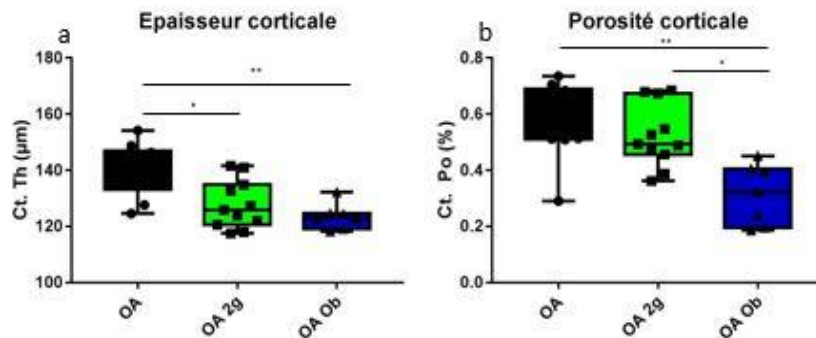


Figure 77 : Paramètres corticaux diaphysaires, Tibia.

(a) Epaisseur corticale, (b) Porosité corticale. Les valeurs sont données en moyenne \pm SD. OA n=10, OA 2g n=10, OA Ob n=7. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Test de Kruskal-Wallis.

Dans la métaphyse tibiale droite, les groupes OA, OA 2g et OA Ob présentent des valeurs d'Oc.S/BS semblables ($p = 0.13$) [Figure 78a]. Du côté de la formation, la MAR est augmentée dans le groupe OA 2g par rapport au groupe OA (+19 %, $p = 0.0062$), alors que le BFR/BS est diminué dans le groupe OA Ob par rapport au groupe OA (-45 %, $p = 0.0042$) et OA 2g (-44 %, $p = 0.0073$) [Figure 78b, c].

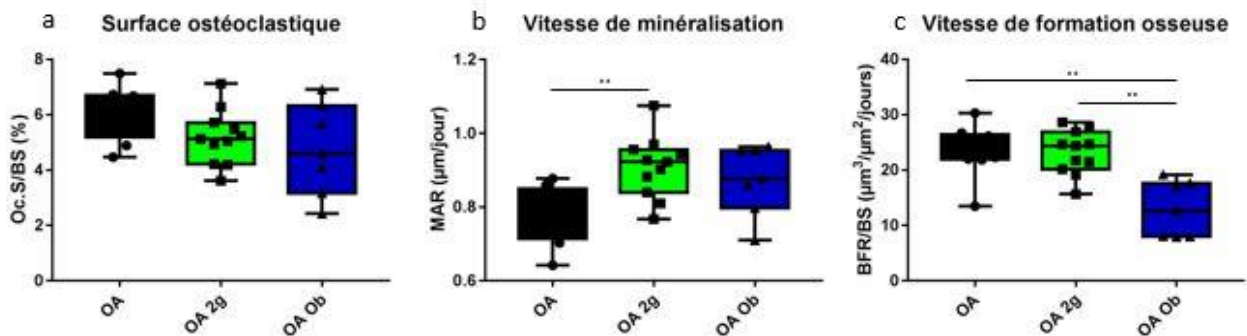


Figure 78 : Paramètres de résorption et de formation osseuses dans la métaphyse tibiale.

(a) Surface ostéoclastique, (b) Vitesse de minéralisation, (c) Vitesse de formation osseuse. Les valeurs sont données en moyenne \pm SD. OA n=10, OA 2g n=7, OA Ob n=7. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Test de Kruskal-Wallis.

Entre les groupes OA, OA 2g et OA Ob, aucune différence n'est mise en évidence pour les facteurs osseux tels que SOST, Runx2 et OCN dans la métaphyse tibiale droite [Figure 79a-c]. L'expression du facteur inflammatoire TNF- α est diminuée dans le groupe OA 2g (-63 %, $p = 0.08$) et OA Ob (-66%, $p = 0.04$) par rapport au groupe OA [Figure 79d]. L'expression des facteurs lipidiques comme PPAR- γ ou C-EBP α sont diminués dans le groupe OA 2g (-50%, $p = 0.07$ et -61%, $p = 0.04$, respectivement) par rapport au groupe OA. Le groupe OA Ob ne présente pas de différence avec le groupe OA et OA 2g pour ces paramètres [Figure 79e, f].

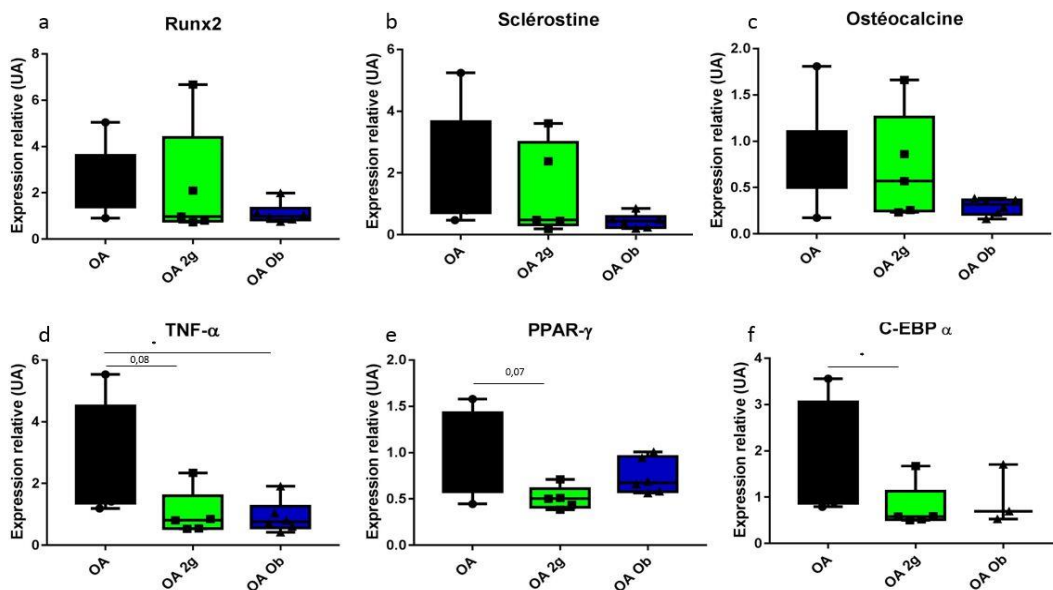


Figure 79 : Expressions géniques dans la métaphyse tibiale droite.

(a) Expression des ARNm de Runx2, (b) Sclérostine, (c) Ostéocalcine, (d) TNF- α , (e) PPAR- γ , (f) C-EBP α . Les valeurs sont données en moyenne \pm SD. OA n=6, OA 2g n=6, OA Ob n=8. * $p < 0,05$. Test de Kruskal-Wallis.

C. Paramètres musculaires

Le test de Kondziela ne permet pas de différencier les 3 groupes. Dans le groupe OA Ob les pourcentages moyens des masses musculaires des muscles tibialis droit et gauche sont diminués significativement (-27% et -22% respectivement) par rapport au groupe OA et OA 2g (eux-mêmes non différent l'un de l'autre). Les mêmes résultats sont retrouvés pour les masses musculaires relatives des muscles gastrocnémiens droit et gauche, diminution dans le groupe OA Ob (-25% et -22% respectivement) par rapport au groupe OA et OA 2g. Dans le muscle soléaire gauche, il y a aucune différence entre les 3 groupes. Alors que dans le groupe OA Ob,

les masses relatives du muscle soléaire droit diminuent (-26 % et -30 %, respectivement) par rapport au groupe OA et OA 2g [Figure 80a-d].

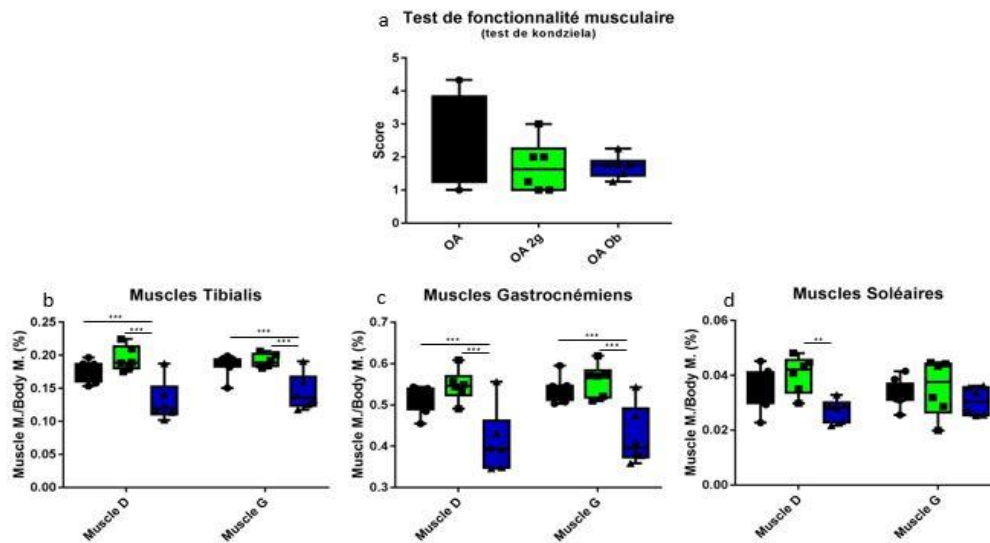


Figure 80 : Paramètres musculaires généraux.

(a) Test de fonctionnalité musculaire globale, (b) Pourcentage de masse des muscles Tibialis, (c) Pourcentage de masse des muscles Gastrocnémiens, (d) Pourcentage de masse des muscles Soléaires, Les valeurs sont données en moyenne \pm SD. OA n=8, OA 2g n=6, OA Ob n=6. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Test de Kruskal-Wallis.

L'aire des fibres du muscle soléaire droit augmente dans les groupes OA 2g (+43 %, $p = 0.0029$) et OA Ob (+26 %, $p = 0.06$) versus le groupe OA, les groupes OA 2g et OA Ob ne diffèrent pas l'un de l'autre [Figure 81a et f]. Dans le groupe OA 2g, les fibres de types I sont augmentés par rapport au groupe OA (+27 %, $p = 0.016$) et OA Ob (+25 %, $p = 0.03$). Inversement, les fibres de types II sont diminuées dans le groupe OA 2g par rapport au groupe OA (-13 %, $p = 0.016$) et au groupe OA Ob (-12 %, respectivement, $p = 0.03$). Le typage de fibre ne diffère pas entre le groupe OA et OA Ob [Figure 81b].

Au niveau vasculaire dans le muscle, le groupe OA Ob montre une diminution de la densité vasculaire et du nombre de vaisseaux/fibres par rapport au groupe OA (-26%, $p = 0.0003$ et -20 %, $p = 0.01$, respectivement). Le groupe OA 2g présente uniquement une diminution de sa densité vasculaire (-12 %, $p = 0.08$) par rapport au groupe OA [Figure 81c, d et g]. Le groupe OA Ob présente un pourcentage de fibre avec des gouttelettes lipidiques augmentée par rapport au groupe OA et OA 2g (46.15 % versus 0.58 % et 0.32 % respectivement). Les groupes OA et OA 2g sont semblables [Figure 81 e, h].

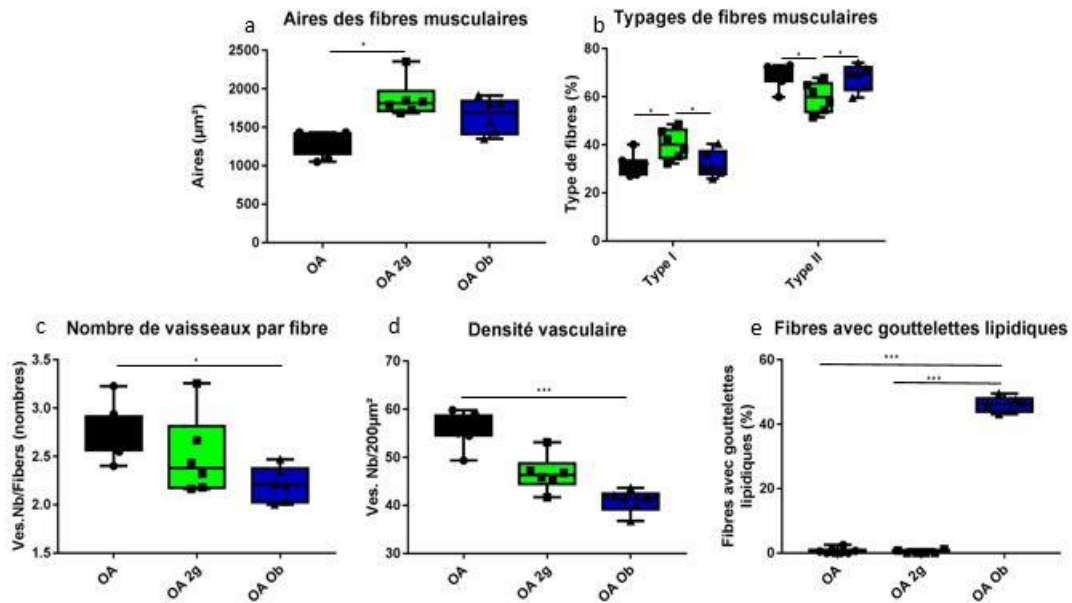


Figure 81 : Paramètres morphologiques du muscle soléaire droit.

(a) Aires des fibres musculaires, (b) Typage de fibres musculaires, (c) Fibres avec gouttelettes lipidiques, (d) Nombre de vaisseaux par fibre, (e) Densité vasculaire. Les valeurs sont données en moyenne \pm SD. OA n=8, OA 2g n=6, OA Ob n=6. * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001. Test de Kruskal-Wallis.

Dans le muscle gastrocnémien droit, l'expression de la myostatine reste inchangé entre les 3 groupes. L'expression de son récepteur (Act RIIb) est augmentée dans le groupes OA 2g par rapport au groupe OA (+936 %, p = 0.007) et le groupe OA Ob n'est pas différent des groupes OA et OA 2g. L'expression de la visfatine est augmentée dans le groupe OA Ob et OA 2g par

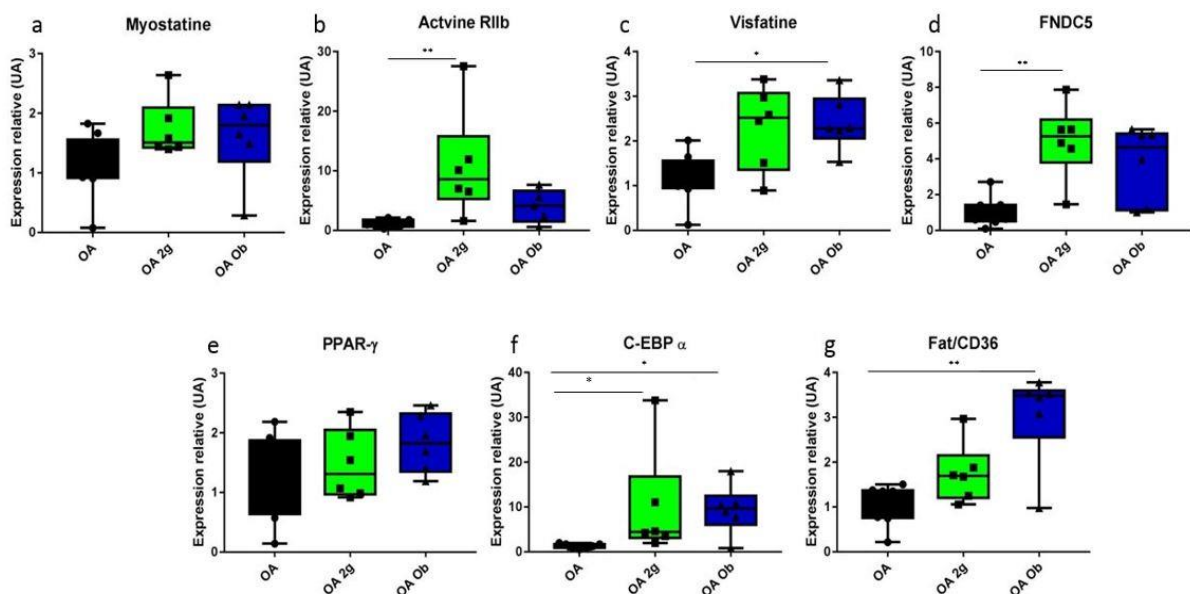


Figure 82 : Expressions géniques dans le muscle gastrocnémien droit.

(a) Expression des ARNm de la Myostatine, (b) de l'Activine RIIb, (c) de la Visfatine, (d) de FNDC5, (e) de PPAR-γ (f) de C-EBPα, (g) de FAT/CD36. Les valeurs sont données en moyenne \pm SD. OA n=6, OA 2g n=6, OA Ob n=6. * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001. Test de Kruskal-Wallis.

rapport au groupe OA (+94 %, $p = 0.03$ et +104 %, $p = 0.06$, respectivement). L'expression de FNDC5 est augmentée pour les groupes OA 2g et OA Ob par rapport au groupe OA (+ 388%, $p = 0.004$ et + 264%, $p = 0.08$, respectivement) [Figure 82a-d].

Pour les voies adipocytaires, les 3 groupes ne présentent aucune variation pour l'expression de PPAR- γ . L'expression de C-EBP α est augmentée dans les groupes OA 2g et OA Ob par rapport au groupe OA (+242 %, $p = 0.037$ et +227 %, $p = 0.031$, respectivement) et les groupes OA 2g et OA Ob ne sont pas différents l'un de l'autre. Le transporteur FAT/CD36, augmente dans le groupe OA Ob par rapport au groupe OA (+196 %, $p = 0.006$) et le groupe OA 2g présente un phénotype intermédiaire au groupe OA et OA Ob [Figure 82e-g].

Au niveau sérique, l'irisine comme de la visfatine, ne montrent aucune différence entre les groupes OA, OA 2g et OA Ob. Entre l'expression musculaire et la concentration sérique de l'irisine ($r = -0.26$, $p = 0.26$) ou de la visfatine ($r = -0.40$, $p = 0.081$), il n'y a pas de corrélation [Figure 83a-d].

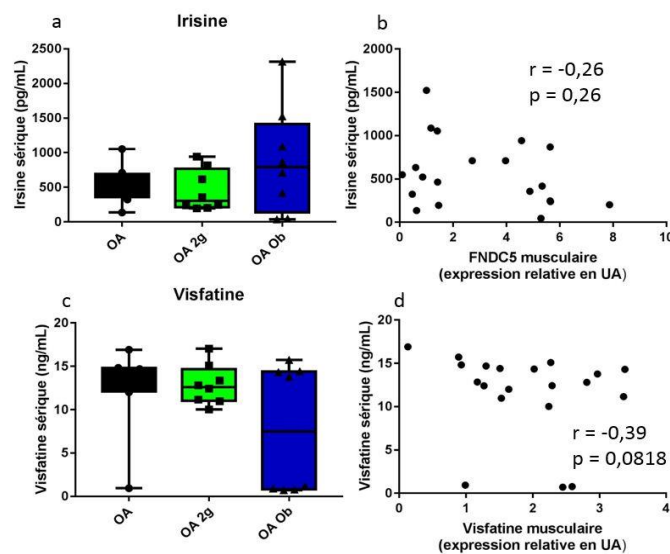


Figure 83 : Concentration sérique en protéines.

(a) Irisine, (b) Corrélation entre l'Irisine sérique et son expression musculaire FNDC5, (c) Visfatine, (d) Corrélation entre la Visfatine sérique et son expression musculaire. Les valeurs sont données en moyenne \pm SD. OA n=8, OA 2g n=8, OA Ob n=8. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Test de Kruskal-Wallis et test de Spearman pour les corrélations.

III. Discussion

Dans les modèles murins d'arthrose du genou qu'ils soient chimiques[318], génétiques[319] ou chirurgicaux[258] comme dans notre cas, c'est l'os sous-chondral voire l'épiphyse qui sont

le plus souvent analysés[320]. Peu de travaux se sont intéressés aux modifications musculo-squelettiques à distance de l'articulation dans les modèles murins. Un des rares exemples est représenté par les souris SRT/ort qui développent une arthrose en lien avec une inflammation locale et systémique[321] et des investigations radiologiques (radiographies digitalisées) montrent une perte de masse musculaire et osseuse du membre postérieur que les auteurs attribuent à des douleurs et/ou des ostéophytes qui limitent les mouvements[322].

Par ailleurs, il est bien décrit que l'obésité est un facteur aggravant de l'OA[3]. Ainsi, le score de Mankin (similaire au score OARSI) est plus rapidement augmenté dans l'OA lorsque l'obésité est avérée[323]. Toutefois avec le score OARSI, qui manque de sensibilité (surtout sur coupes MMA), le grade de l'OA est le même dans tous nos groupes. Une analyse plus fine en coupe paraffine aurait peut-être détecté une aggravation chez les obèses.

Pourtant le sujet est pertinent sur le plan médical et physiologique. Ainsi, Poulet B et al.[324] ont montré, par analyse transcriptomique, que les chondrocytes articulaires partagent de nombreuses expressions géniques avec le muscle squelettique et que l'incapacité à moduler ce programme, en association avec une expression inappropriée des voies de signalisation NF- κ B induit et fait progresser l'OA. Comme nous l'avons décrit précédemment, la triade os-muscle-gras incluant également les articulations est une réalité avec de nombreuses régulations croisées. Récemment des travaux visent à évaluer le potentiel de cellules souches d'origine musculaire pour la régénération et réparation du cartilage[325].

En ce qui concerne les effets de l'OA chez des sujets sains (Ctrl), on observe une inflammation osseuse (expression génique de TNF α augmentée) mais pas d'inflammation systémique ou musculaire confirmant qu'il s'agit d'une arthrose modérée (voir chap. validation modèle). Chez des personnes arthrosiques, la visfatine augmente au niveau de la membrane synoviale de l'articulation[326]. Dans notre étude, nous n'avons pas mesuré la visfatine au niveau articulaire, mais sa concentration sérique est inchangée, suggérant là encore la sévérité relative de l'arthrose dans notre modèle.

Chez les animaux du groupe Ctrl, l'OA induit des changements majeurs dans l'os trabéculaire métaphysaire du tibia proximal du genou atteint. Cette perte osseuse est surtout liée à une résorption osseuse stimulée, probablement en lien avec l'inflammation locale. L'os cortical est lui préservé. De plus, les muscles de la patte atteinte sont assez peu modifiés. L'os sous

chondral et l'épiphyse (sites habituellement étudiés) ont été analysés par Damien Cleret. Comme attendu[327], une tendance à l'augmentation de l'épaisseur de la plaque osseuse sous-chondrale, caractéristique de l'arthrose est observée dans notre modèle. Au niveau épiphysaire, il n'y a pas de perte osseuse trabéculaire mais les paramètres de formation osseuse (MAR et BFR/BS) sont augmentés. Les compartiments épiphysaires et métaphysaires du tibia répondent donc différemment ce qui met en avant l'importance et l'intérêt de regarder toutes les zones du système osseux pour avoir une vision globale des actions de l'OA.

En ce qui concerne les investigations musculaires, la comparaison entre Ctrl et OA ne montre pas de changement pour le test fonctionnel et les masses musculaires ce qui suggère une utilisation normale de la patte postérieure arthrosique et donc une absence de douleur au mouvement. Cependant on note un déconditionnement musculaire avec diminution de l'aire des fibres, chaque fibre étant moins vascularisée chez les arthrosiques.

Pour ce qui est de l'influence de l'obésité, nous nous attendions à une aggravation de la dégradation des paramètres osseux observés chez les non OA. Les résultats sont plus nuancés. Si l'OA chez les obèses MM (versus le groupe OA) ne modifie pas le volume osseux trabéculaire, elle entraîne une diminution de l'épaisseur corticale, de la formation osseuse et de la vascularisation médullaire ainsi qu'une augmentation des adipocytes médullaires, facteurs en faveur d'une aggravation de la fragilité du squelette. A l'opposé, la diminution de la porosité corticale et l'augmentation de l'épaisseur des travées sont en faveur d'un os moins fragile. Cette hétérogénéité de réponse entre compartiments osseux a été décrite dans un modèle d'arthrite de genou chez des souris soumises à un régime HFD 45%[270] qui présentent, à l'inverse de nos souris arthrosiques, une perte osseuse trabéculaire du fémur distal sans modification de l'épaisseur corticale à la diaphyse fémorale (la porosité n'a pas été mesurée).

En revanche, dans l'obésité M (OA vs OA 2g), tous les paramètres trabéculaires osseux vont dans le sens d'un renforcement squelettique (et augmentation de la MAR) avec l'hypergravité. Cependant l'épaisseur corticale diminue ce qui pourrait fragiliser la structure. L'arthrose associée à l'hypergravité paraît donc fragiliser l'os cortical de manière plus importante que l'arthrose associée à l'obésité MM [Figure 65a]. La hausse des adipocytes médullaires chez les OA 2g semble en désaccord avec la diminution de l'expression des facteurs PPAR- γ et C-EBP α . Il se pourrait que notre analyse soit postérieure à cette diminution, consécutive à une

augmentation précoce et transitoire de ces facteurs qui ont stimulé l'apparition des adipocytes. Cependant, à ce stade, nous n'avons pas d'explication sur le fait que les OA n'ont pas d'invasion graisseuse médullaire (vs. Ctrl) alors que les OA 2g oui.

Au même titre que l'os, l'hypothèse pour le muscle est que l'obésité MM conduit à une fragilisation des paramètres musculaires et que l'obésité M la prévient chez les OA. Cette hypothèse est validée. En effet, l'obésité MM, conduit à une diminution des masses musculaires par augmentation des voies cataboliques (visfatine) et diminution des voies anaboliques (FNDC5) par rapport au groupe OA. Ces résultats correspondent à ceux obtenus chez des patients arthrosiques qui présentent une atrophie et une diminution de la force musculaire au niveau du quadriceps[328]. Le muscle soléaire présente aussi une diminution de sa vascularisation (densité et nombre de vaisseaux) et une augmentation d'IMCL qui coïncident avec l'augmentation du transporteur membranaire et des voies lipidiques (déjà décrits, partie 2). Ainsi parmi les souris arthrosiques, ce sont celles qui sont obèses qui ont les muscles les plus fragiles. En revanche, lorsque l'on compare les animaux MM qui ont une arthrose avec ceux qui n'en ont pas, on ne voit pratiquement pas de différence au niveau musculaire (les seules différences étant une densité vasculaire diminuée et une expression de C-EBP α augmentée chez les Ob OA). C'est donc l'obésité qui prime sur l'arthrose sur la fragilité musculaire.

En revanche, chez les OA, l'obésité M ne modifie pas les masses musculaires (comparaison OA vs OA 2g), elle augmente l'aire des fibres et conduit à un switch des fibres de type II vers le type I (même résultat que chez les animaux 2g, cf partie 2). Au niveau moléculaire, seule l'expression de l'Act RIIb est significativement augmentée, les expressions de visfatine et de FNDC5 présentent une tendance à l'augmentation. Si on considère l'hypergravité comme un substitut d'exercice, il est intéressant de noter que des humains âgés arthrosiques, soumis à des exercices en résistance freinent leur perte musculaire [329], [330].

Chez les 2g, le fait d'être arthrosique (comparaison 2g vs OA 2g) empêche le gain de masse musculaire mais conserve la morphologie et typologie musculaires caractéristique des souris non OA 2g. L'ajout de l'OA dans l'obésité M entraîne une relative faiblesse musculaire dont les causes paraissent plutôt intrinsèques que liées à la douleur. En effet des tests de roue d'activité dans la centrifugeuse n'ont pas montré de différence entre les 2g et 2g OA (données obtenues sur quelques individus et non montrés).

En conclusion, l'obésité MM et M n'aggravent pas l'arthrose sur la base du score OARSI et de la présence d'ostéophytes. L'obésité MM diminue l'épaisseur corticale et les masses musculaires des animaux arthrosiques. A l'opposé l'obésité M renforce l'os trabéculaire, mais pas cortical des souris OA. Comme l'os cortical des OA Ctrl n'est pas atteint, on peut conclure que l'ajout d'une contrainte mécanique, soit par l'obésité MM ou M, est un facteur délétère pour l'os cortical des animaux arthrosiques. Même chez les souris OA, l'obésité M induit une typologie « exercice en résistance » sans hypertrophie musculaire. Cet effet protecteur partiel est peut-être à mettre en lien avec le fait que les conditions 2g et OA ont été appliquées pratiquement simultanément ce qui n'est pas le cas de l'OA chez les MM qui a été induite chez des souris déjà obèses (régime HFD post-sevrage). Cependant rappelons que les souris Ob présentent spontanément des signes d'arthrose vu la présence d'ostéophyte. Donc la comparaison Ob/Ob OA minimise sans doute les différences qui auraient pu être observées si les deux conditions avaient été générées au même moment et si les Ob n'avaient eu aucun signe arthrosique.

Partie 4 : Effets des vibrations corps entiers dans un modèle d'obésité pathologique combinant ou pas une arthrose post-traumatique

Dans cette partie, nous analysons le potentiel d'amélioration des paramètres musculo-squelettiques par des vibrations corps entier (90Hz, 0.5g) à raison de 15 min/jour, 5 jours/7 pendant 4 semaines. Ce traitement est fait sur des animaux avec une obésité MM OA ou non. Pour cela, les groupes utilisés sont, le groupe Ob et OA Ob qui seront les groupes de références et les groupes Ob vib et OA Ob vib.

I. Résultats

A. Paramètres métaboliques

Les quatre groupes présentent les mêmes caractéristiques d'obésité, une masse corporelle, une stéatose hépatique et un score HOMA-IR semblables [Figure 84a-c].

Au niveau sérique, il n'y a aucune différence entre les groupes pour la concentration de corticostérone, du TNF- α [Figure 84d, e].

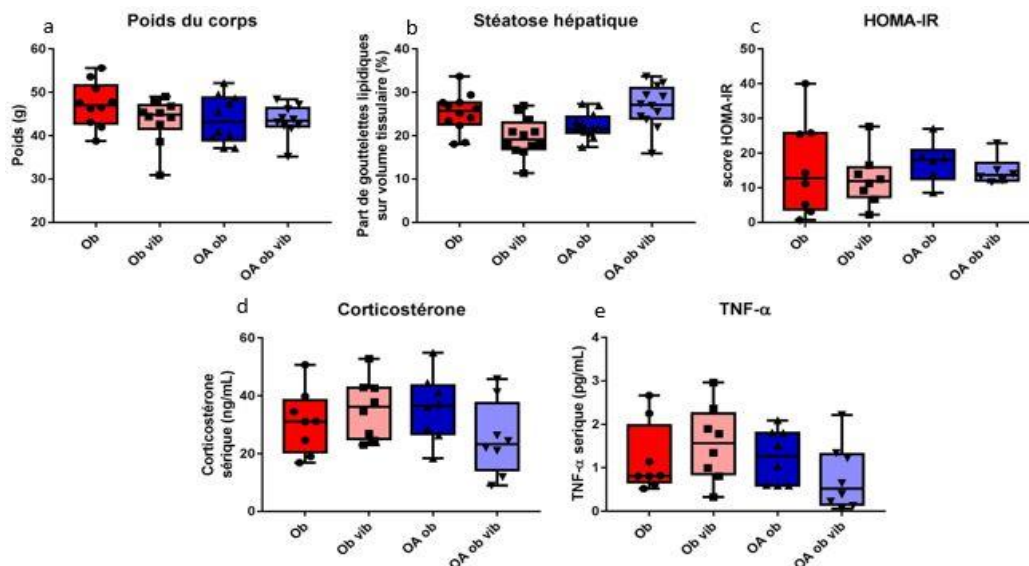


Figure 84 : Caractérisation du modèle métabolique.

(a) Poids du corps, (b) Stéatose hépatique, (c) HOMA-IR, (d) concentration sérique en corticostérone, (e) concentration sérique en TNF- α . Les valeurs sont données en moyenne \pm SD. Ob n= 8, Ob vib n=8, OA Ob n= 8, OA Ob vib n=8. * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001. Test ANOVA 2 voies

Le score OARSI est augmenté dans les groupes OA Ob et OA Ob vib par rapport au groupe Ob et Ob vib. Mais les ostéophytes sont retrouvés dans tous les groupes arthrosiques (90%) ou non (70%). La vibration n'induit pas de différence avec les groupes de référence [Figure 85a, b].

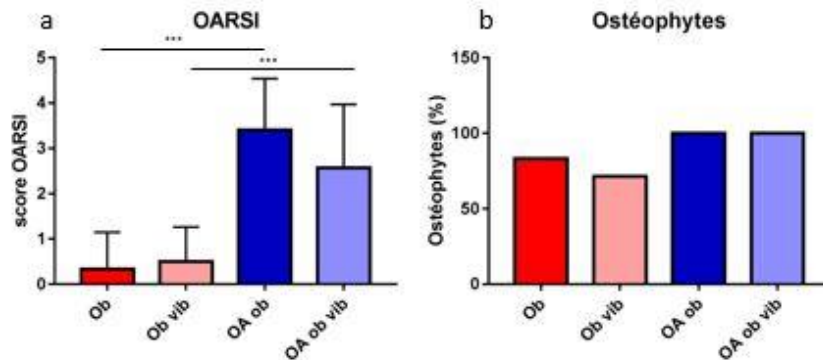


Figure 85 : Caractérisation de l'arthrose.

(a) Score OARSI, (b) Pourcentage d'ostéophytes. Les valeurs sont données en moyenne \pm SD. Ob n= 7, Ob vib n=7, OA Ob n=7, OA Ob vib n=7. * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001. Test ANOVA 2 voies.

B. Paramètres osseux

Dans la métaphyse tibiale, les paramètres osseux trabéculaires (BV/TV, Tb.Th, Tb.Sp, Tb. N) ne sont pas modifiés entre les groupes quelque soient les conditions [Figure 86a-d].

Dans la cavité médullaire tibiale, la densité vasculaire n'est pas différente entre les quatre groupes, on note malgré tout une tendance à l'augmentation chez les Ob vib par rapport aux Ob. Le volume vasculaire est augmenté dans les groupes vibrés (Ob vib vs Ob : +28 %, p = 0.03

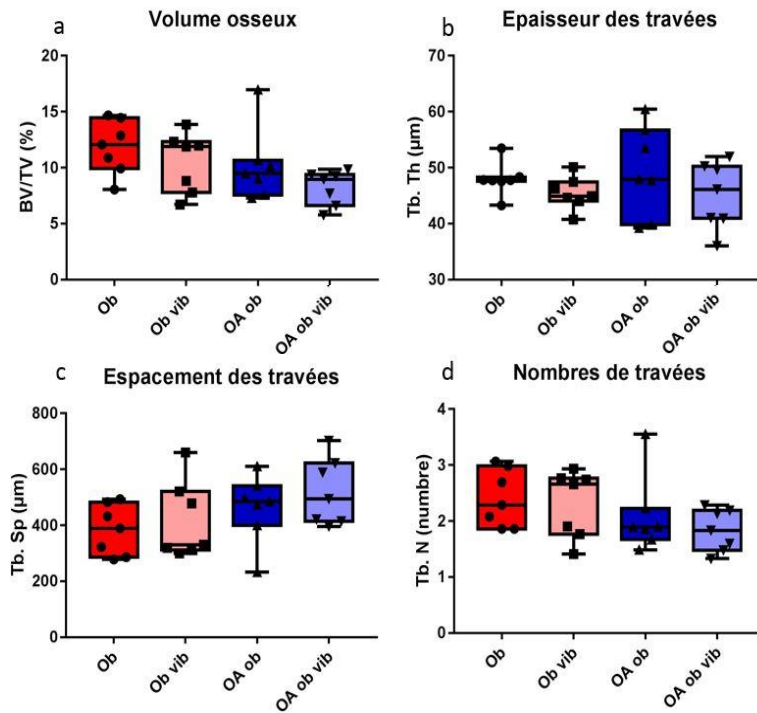


Figure 86 : Paramètres osseux trabéculaires, métaphyse tibiale.

(a) Volume osseux, (b) Epaisseur des travées, (c) Espacement des travées (d) Nombres de travées, Les valeurs sont données en moyenne \pm SD. Ob n= 7, Ob vib n=7, OA Ob n=7, OA Ob vib n=7. * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001. Test ANOVA 2 voies.

et OA Ob vib vs OA Ob : +17 %, p = 0.03) [Figure 87a, b]. La densité adipocytaire ne varie pas entre les groupes, mais on note une tendance à la diminution chez les Ob vib vs.Ob [Figure 87c].

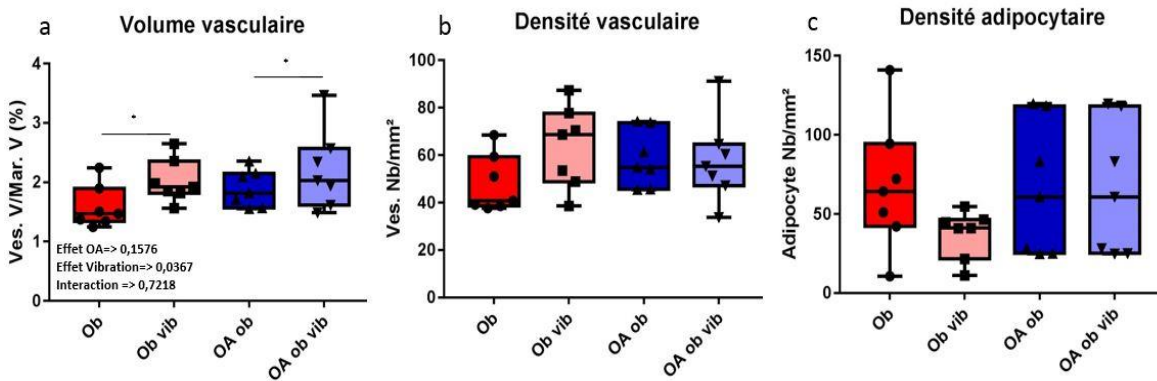


Figure 87 : Paramètres vasculaires et adipocytaires métaphysaires.

(a) Volume vasculaire, (b) Densité vasculaire, (c) Densité adipocytaire. Les valeurs sont données en moyenne \pm SD. . Ob n= 7, Ob vib n=7, OA Ob n=7, OA Ob vib n=7. * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001. Test ANOVA 2 voies.

L'épaisseur de l'os cortical en diaphyse tibiale est la même dans les quatre groupes. La porosité corticale est augmentée dans le groupe Ob vib (+70 %, p = 0.025) par rapport au groupe Ob [Figure 88a, b].

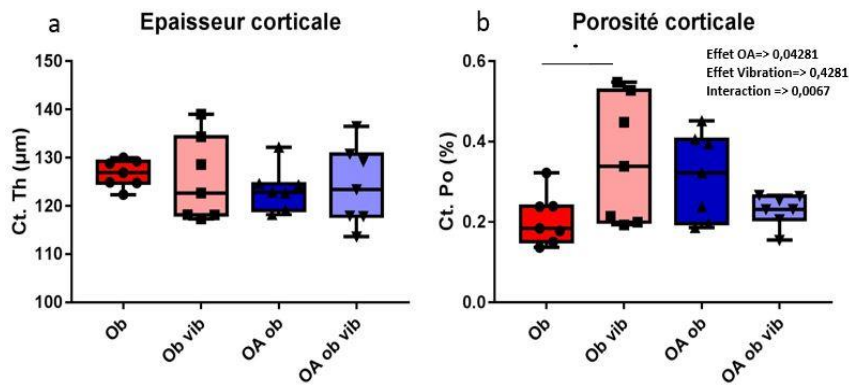


Figure 88 : Paramètres corticaux diaphysaires, Tibia.

(a) Epaisseur corticale, (b) Porosité corticale. Les valeurs sont données en moyenne \pm SD. Ob n=7, Ob vib n=7, OA Ob n=7, OA Ob vib n=7. * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001. Test ANOVA 2 voies.

La résorption ostéoclastique (Oc.S/BS) est diminuée dans le groupe Ob vib par rapport au groupe Ob (-35 %, p = 0.0032) et au groupe OA Ob vib (-51 %, p = 0.054), les groupes OA Ob et OA Ob vib n'étant pas différents [Figure 89a]. Pour la formation osseuse, aussi bien pour la MAR que pour le BFR/BS, aucune différence n'est mise en évidence [Figure 89b, c].

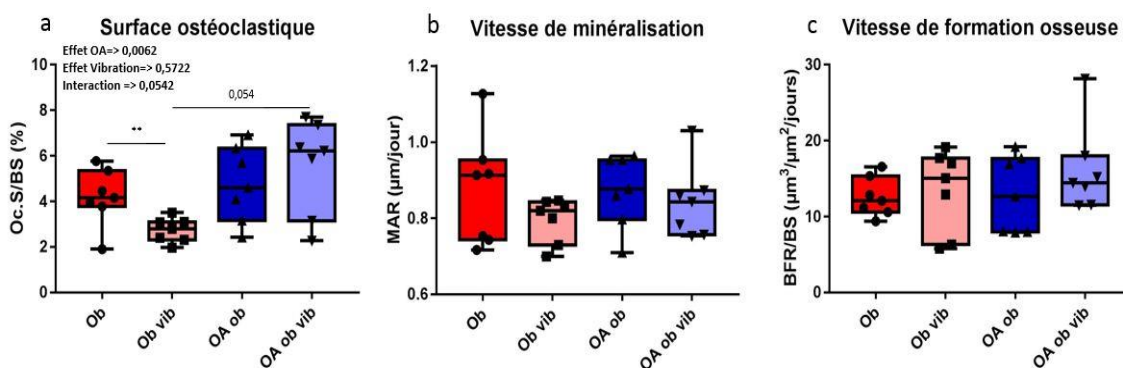


Figure 89 : Paramètres de résorption et de formation osseuses dans la métaphyse tibiale.

(a) Surface ostéoclastique, (b) Vitesse de minéralisation, (c) Vitesse de formation osseuse. Les valeurs sont données en moyenne \pm SD. Ob n=7, Ob vib n=7, OA Ob n=7, OA Ob vib n=7. * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001. Test ANOVA 2 voies.

Ces groupes ne présentent pas de différence dans l'expression des facteurs osseux Runx2 et OCN [Figure 90a, c]. L'expression de SOST est diminuée dans le groupe OA Ob par rapport au groupe Ob (-75 %, p = 0.027) et dans le groupe OA Ob vib par rapport au groupe Ob vib (-74 %, p = 0.027) [Figure 90b]. L'expression du TNF- α ou des marqueurs des voies lipidiques (PPAR- γ , C-EBP α) ne montre aucune différence entre les groupes [Figure 90d-f].

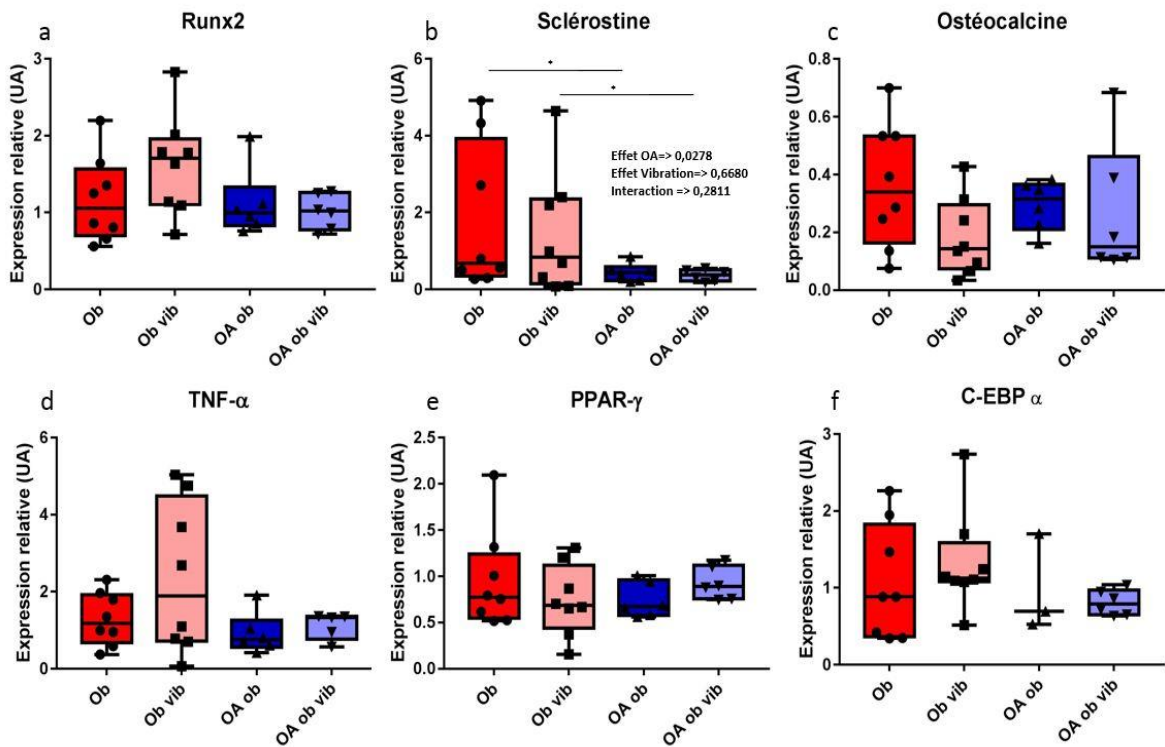


Figure 90 : Expressions géniques dans la métaphyse tibiale droite.

(a) Expression des ARNm de Runx2, (b) Sclérostine, (c) Ostéocalcine, (d) TNF- α , (e) PPAR- γ , (f) C-EBP α . Les valeurs sont données en moyenne \pm SD. Ob n=7, Ob vib n=7, OA Ob n=7, OA Ob vib n=7. * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001. Test ANOVA 2 voies.

C. Paramètres musculaires

Les scores obtenus par le test de Kondziela et les masses relatives des muscles tibialis, gastrocnémien et soléaire ne diffèrent pas entre les groupes. Aucune différence n'est également mise en évidence entre muscles droits et gauches [Figure 91a-d].

L'aire des fibres entre les groupes Ob, Ob vib, OA Ob et OA Ob vib est statistiquement la même. Il n'y a pas non plus de variation dans le typage de fibres entre les 4 groupes (environ 33% de fibres de types I et 66% de fibres de type II) [Figure 92a, b].

Le nombre de vaisseaux/fibre est diminué dans le groupe OA Ob par rapport au groupe Ob (-17 %, p = 0.03), comme montré précédemment (partie 3-c) et dans le groupe OA Ob vib par rapport au groupe Ob vib (-10 %, p = 0.03). Il semble donc que c'est l'OA qui fait diminuer ce paramètre, les vibrations n'ayant pas d'effet [Figure 92c, d]. En regardant le pourcentage de fibres

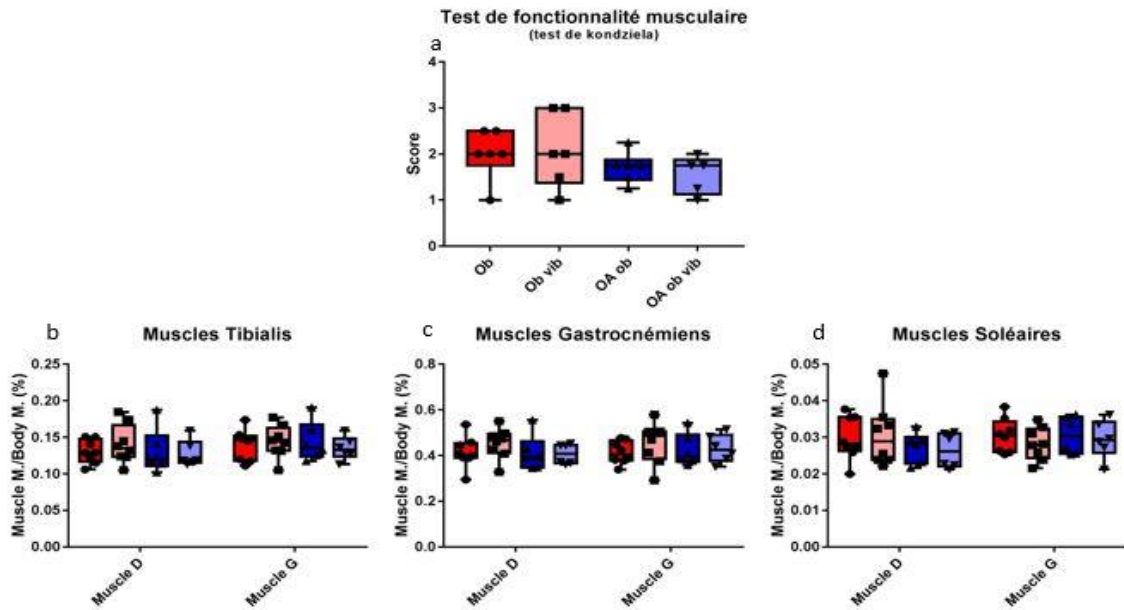


Figure 91 : Paramètres musculaires généraux.

(a) Test de fonctionnalité musculaire globale, (b) Pourcentage de masse des muscles Tibialis, (c) Pourcentage de masse des muscles Gastrocnémiens, (d) Pourcentage de masse des muscles Soléaires, Les valeurs sont données en moyenne \pm SD. Ob n=6, Ob vib n=6, OA Ob n=6, OA Ob vib n=6. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Test ANOVA 2 voies.

avec des gouttelettes lipidiques, les résultats ne montrent pas de différences entre les groupes (environ 47 % des fibres ont des gouttelettes lipidiques) [Figure 92e].

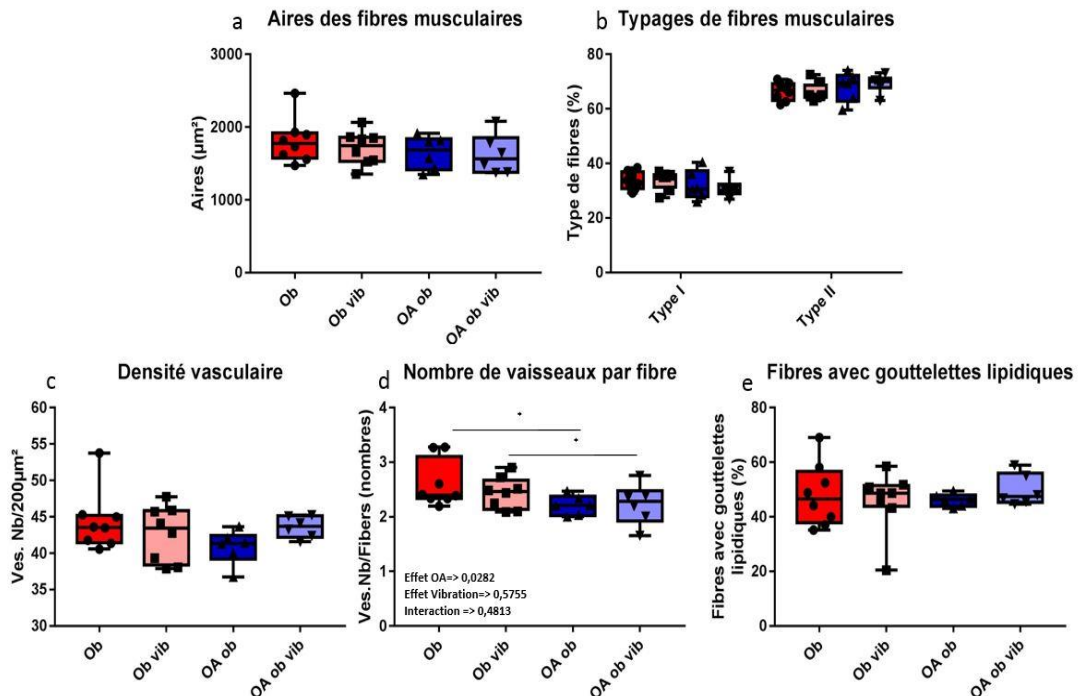


Figure 92 : Paramètres morphologiques du muscle soléaire droit.

(a) Aires des fibres musculaires, (b) Typage de fibres musculaires, (c) Fibres avec gouttelettes lipidiques, (d) Nombre de vaisseaux par fibre, (e) Densité vasculaire. Les valeurs sont données en moyenne \pm SD. Ob n= 6, Ob vib n=6, OA Ob n=6, OA Ob vib n=6. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Test ANOVA 2 voies.

L'expression de la myostatine est diminuée par la vibration dans le groupe Ob vib (-30 % vs.Ob, $p = 0.025$) et dans le groupe OA Ob vib (-41 % vs OA Ob, $p = 0.025$). En ce qui concerne l'expression du récepteur de la myostatine (Act RIIb), de la visfatine et de FNDC5, on remarque les mêmes profils : leurs expressions très augmentées chez les OA Ob diminuent chez les OA Ob vib. Il n'y a pas de différence significative entre Ob et Ob vib, mais des tendances à la diminution [Figure 93a-d].

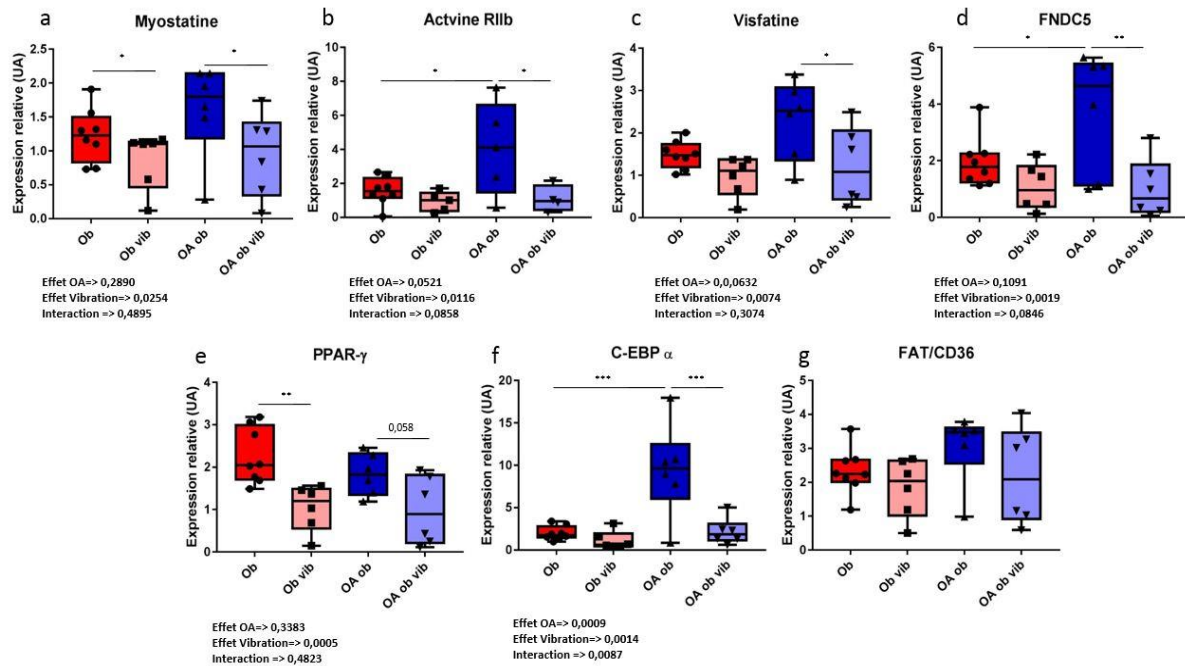


Figure 93 : Expressions géniques dans le muscle gastrocnémien droit.

(a) Expression des ARNm de la Myostatine, (b) de l'Activine RIIb, (c) de la Visfatine, (d) de FNDC5, (e) de PPAR- γ (f) de C-EBP α , (g) de FAT/CD36. Les valeurs sont données en moyenne \pm SD. Ob n= 6, Ob vib n=6, OA Ob n=6, OA Ob vib n=6. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Test ANOVA 2 voies.

L'expression de PPAR- γ est diminuée dans les groupes vibrés : -54 % entre Ob vib et Ob ($p = 0.004$) et -46 % entre OA Ob vib et OA Ob ($p = 0.06$). L'expression de C-EBP α suit en gros le même profil, avec diminution de 331% entre OA Ob et OA Ob vib ($p = 0.0001$). Donc la vibration diminue l'expression de tous ces gènes, de manière significative ou tendancielle chez les non OA, mais toujours très significative chez les OA. En revanche, l'expression du transporteur FAT/CD36 est la même dans tous les groupes [Figure 93e-g].

La concentration sérique de visfatine n'est pas différente entre les 4 groupes. Il n'y a pas non plus de corrélation entre l'expression de la visfatine dans le muscle et sa concentration sérique ($r = -0.07$, $p = 0.73$). L'irisine sérique est augmentée dans le groupe Ob vib par rapport au

groupe Ob (+109 %, $p = 0.024$) et au groupe OA Ob vib (+109 %, $p = 0.0097$). Les taux d'irisine sérique et son expression musculaire ne sont pas corrélés ($r = -0.24$, $p = 0.24$) [Figure 94a-d].

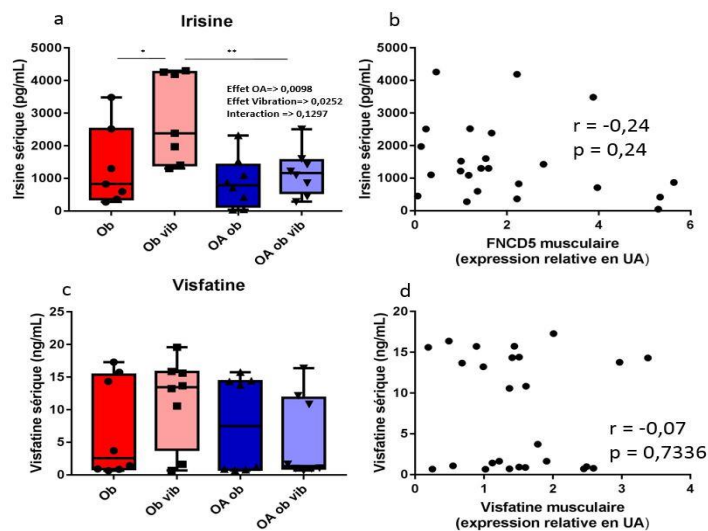


Figure 94 : Concentration sérique en protéines.

(a) Irisine, (b) Corrélation entre l'Irisine sérique et son expression musculaire FNDC5, (c) Visfatine, (d) Corrélation entre la Visfatine sérique et son expression musculaire. Les valeurs sont données en moyenne \pm SD. Ob $n = 6$, Ob vib $n = 6$, OA Ob $n = 6$, OA Ob vib $n = 6$. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Test ANOVA 2 voies.

II. Discussion

Nous avons analysé les effets d'un traitement WBV sur des animaux obèses ou obèses arthrosiques avec l'hypothèse que les vibrations permettent de réduire l'aggravation de l'obésité et/ou de l'OA par un renforcement du système musculo-squelettique.

Dans la littérature, de nombreuses études sur les vibrations ont été faites. L'inconvénient est l'hétérogénéité des protocoles et donc des résultats. En effet, la durée des séances de vibration, la durée du protocole, les caractéristiques du signal vibratoire (fréquence et amplitude) sont une source de variabilité entre les études. La conclusion d'une revue de la littérature [260] nous a permis de choisir le protocole qui nous paraissait le plus adapté à notre question. Les études de Pasqualini et al[259] et Rubin et al[331], ont montré qu'une fréquence de 90Hz et un protocole de 4 semaines, 10 min/j pendant 5j/7 augmentaient la formation osseuse et renforçaient les paramètres trabéculaires et corticales des os longs.

Dans notre étude, les vibrations ne génèrent pas de perte de gras viscéral, sous cutané, ou intramusculaire, ni d'amélioration du score HOMA-IR. Cependant, un régime vibratoire haute

intensité et basse fréquence a montré un effet bénéfique sur l'obésité, par la diminution de la masse grasse viscérale et de la stéatose hépatique[332]. D'autres conditions plus proches des nôtres (90Hz, 15min/jours et a 0,2g) montrent aussi une diminution des masses grasses abdominale et viscérale[333]. Dans notre étude, nous ne trouvons pas non plus de variation du score OARSI et du nombre d'ostéophytes entre les groupes (OA d'un côté et non OA de l'autre), en accord avec [334, p. 57], qui explique que la souche C57BL6 (celle que nous utilisons) est résistante à la dégradation du cartilage par les vibrations dans l'OA. Cette résistance n'est pas retrouvée pour la souche BalB/c. Les résultats sur l'aggravation de l'OA sont donc influencés par la souche des souris.

Sur le plan microstructural osseux ou macroscopique musculaire, le régime vibratoire choisi n'a pas d'influence, ni négative, ni positive, sauf au niveau cortical où la porosité augmente chez les Ob Vib vs les non vibrés. En fait la porosité corticale, très diminuée chez les Ob (valeur de 0.2% en moyenne), revient à un taux presque équivalent à celui des Ctrl (valeur de 0.53% en moyenne) chez les Ob vib (valeur de 0.35% en moyenne). On peut donc conclure que ce régime vibratoire est relativement neutre dans notre modèle. Nos résultats osseux vont dans le même sens que ceux de Luu et al[335], qui montrent aucun changement de l'expression des principaux facteurs ostéogènes et adipogènes chez des souris C57BL6J vibrées déjà obèses, contrairement à des souris soumises, en même temps à la vibration et au régime alimentaire obésogène. Une étude similaire à la nôtre (90Hz, 15min/j pendant 5 jours/7 avec une accélération de 0.3 ou 1g) ne montre pas de variation de l'os trabéculaire ou de la formation osseuse [292]. Une autre étude avec des conditions différentes (45Hz ou lieu de 90Hz) trouve une diminution de la résorption osseuse et un maintien de la formation [293].

Cependant notre étude montre, au niveau médullaire, une tendance marquée à la diminution de l'adiposité (très augmentée chez les Ob) chez les souris vibrées non OA. Elle montre aussi une augmentation de la vascularisation (très diminuée chez les Ob) par la vibration chez les non OA et OA qui n'atteint toutefois pas encore les niveaux des Ctrl. Cette augmentation du VV/MV dans les groupes vibrés avait également été observée dans une étude faite au laboratoire chez des jeunes souris non obèses[115].

Dans notre étude, les expressions des gènes osseux ne sont pas modifiées excepté pour SOST. Sa diminution, au niveau osseux, est le fait de l'OA (nos résultats de la partie 3-c, ne montrait

qu'une tendance, l'ajout des groupes vibrés et le changement de test fait que la p valeur devient significative) et non des vibrations. L'implication de SOST dans l'OA est dépendante du site d'observation. Une augmentation de SOST par les chondrocytes hypertrophiques a été détectée à des stages différents de sévérité d'OA et son rôle protecteur sur le cartilage arthrosique n'est pas encore unanime [336], [337]. Dans l'os sous-jacent (sous chondral et épiphysaire) arthrosique, l'expression de SOST est diminuée (ce qui est conforme à nos résultats), conduisant à une augmentation de la BMD corticale (résultats non retrouvés)[338]. De plus, l'expression de SOST chondrocytaire paraît varier en fonction du temps, avec une augmentation dans les premiers temps de l'OA puis une diminution [339]. Une cinétique en fonction de la sévérité et du moment de l'analyse pourrait également exister au niveau osseux.

Un rôle anabolique[334] ou catabolique sur l'os murin[340] est rapporté selon le régime vibratoire. Récemment, il a aussi été montré qu'un protocole vibratoire anabolique appliqué trop longtemps (plus de 8 semaines) devenait délétère[340].

Au niveau des muscles, la vibration n'affecte pas les paramètres vasculaires, contrairement à l'os où la vascularisation était augmentée. Un régime vibratoire plus doux (45Hz, 0.3g) mais appliqué à des souris non obèses induit une réduction de la vascularisation du soléaire [341]. Dans notre cas, la vascularisation musculaire, déjà très diminuée par l'obésité, pourrait ne plus répondre au stimulus de la vibration.

Les voies atrophiques représentées par la myostatine sont diminuées par le régime vibratoire chez les non OA mais surtout chez les OA, en accord avec d'autres études *in vitro* puis *in vivo*. En effet, sur des cellules C2C12 et L6C11 (lignées cellulaires myoblastiques), les vibrations augmentent les voies hypertrophiques et diminuent les voies atrophiques dont la myostatine[342]. Chez les OA Ob vib uniquement, les voies inflammatoires (visfatine musculaire) sont également diminuées et montrent une tendance à la diminution au niveau sérique (corticostérone, TNF alpha). Ainsi les vibrations, si elles n'ont pas d'effet anabolique musculaire, semblent limiter les marqueurs cataboliques et inflammatoires. Pour rappel, nous n'avions pas mis en évidence de différence entre le groupe Ctrl et le groupe OA pour ces paramètres d'expression géniques.

Notons aussi que chez les Ob, la vibration entraîne une augmentation de l'irisine sérique. Une telle augmentation est également retrouvée chez des jeunes femmes saines et non obèses

après vibration corps entier [316]. Cependant, comme chez les non OA, nous ne trouvons pas de corrélation entre l'irisine et l'expression de FNDC5 musculaire. Il se pourrait que l'irisine, comme l'IL-6[229], augmente après l'exercice et retrouve un niveau basal très faible entre deux séances[316]. De plus cette étude montre que les pics d'augmentation sont plus importants en fin de protocole[316].

Chez nos souris, il semble que les vibrations aient un début d'action sur le système musculaire avec des effets non visibles macroscopiquement, mais retrouvés au niveau moléculaire. Soit le temps de vibrations n'est pas suffisant ce qui expliquerait l'absence d'effet osseux et le début d'effet musculaire, soit le régime vibratoire n'est pas optimisé.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

L'obésité et le syndrome métabolique sont tous deux associés à un risque accru de fragilité musculo-squelettique, et en particulier d'arthrose. Leurs contributions relatives sur le tissu osseux et musculaire sont mal connues. Nos travaux de thèses avaient pour but d'explorer ces contributions en comparant un modèle murin associant obésité et conditions métaboliques avec un modèle murin mimant le surpoids de l'obésité par exposition à une hypergravité.

Nous avons tout d'abord caractérisé et validé les modèles d'arthrose et d'obésité chez des souris mâles matures. Ainsi les groupes de souris en début de protocole sont homogènes et permettent de dégager les effets réels des inductions et différents traitements testés.

Nous avons ensuite analysé les effets des obésités MM (mécanique et métabolique) et M (mécanique, par exposition à une hypergravité 2g) sur le système musculo-squelettique. Les obèses MM ont un os (tibia proximal) trabéculaire préservé, un os cortical plus fin et moins poreux et un système musculaire fragilisé (diminution de la masse, de la force globale, augmentation du nombre de fibres avec gouttelettes lipidiques). A l'opposé chez les obèses M, l'os est totalement préservé et les muscles sont renforcés (gain de masse, fibres plus orientées vers un profil oxydatif lent, stimulation des voies de signalisation). Ce sont donc les troubles métaboliques qui sont responsables de la fragilisation de l'os cortical et du muscle.

Les conséquences sur l'appareil locomoteur de souris non obèses, obèses MM ou M d'une arthrose post-traumatique du genou (OA) ont été étudiées huit semaines après l'induction. L'OA chez les souris non obèses fragilise l'os trabéculaire de la métaphyse tibiale (et augmente la résorption ostéoclastique) mais n'a aucun effet significatif sur le muscle adjacent à l'articulation arthrosique. L'OA chez les souris obèses MM accentue la diminution de l'épaisseur corticale tout en augmentant sa porosité et n'induit pas de détériorations supérieures à celles de l'obésité MM seule pour les autres paramètres. A contrario, l'OA chez les souris obèses M fragilise l'os cortical et encore plus le muscle.

L'arthrose agit donc différemment chez le sujet sain ou obèse. Chez les sujets obèses MM et M OA le compartiment osseux cortical semble plus sensible à la surcharge mécanique qu'aux troubles métaboliques.

Tableau 3 : Résumé des principaux résultats.

Ob obèse, OA arthrosique, Ctrl contrôle. * indique que plusieurs paramètres sont regroupés sous la même appellation. Une double flèche indique une différence supérieure à 1000%, dans l'os, dans le muscle, dans le sérum.

	Effets des 2 types d'obésité chez les souris non arthrosiques		Effets des 2 types d'obésité chez les souris arthrosiques		Effets de l'arthrose post-traumatique		
	Ctrl versus		OA versus		Ctrl versus OA	Ob versus OA Ob	2g versus OA 2g
	Ob	2g	OA Ob	OA 2g			
BV/TV	---	---	---	↗ 67%	↘ 28%	---	---
Densité vasculaire	↘ 70%	↘ 37%	↘ 65%	---	---	---	↗ 70%
Densité adipocytaire	↗ 419%	---	↗ 801%	↗ 347%	---	---	↗ 995%
Épaisseur corticale	↘ 9%	---	↘ 11.7%	↘ 8.6%	---	↘ 2.6%	↘ 7.53%
Porosité corticale	↘ 61%	---	↘ 45%	---	---	↗ 51%	---
Résorption osseuse	---	---	---	---	↗ 48%	---	---
Formation osseuse	↘ 16% (BFR/BS)	---	↘ 45% (BFR/BS)	↗ 19% (MAR)	---	---	---
Runx2	---	---	---	---	↗ 149%	---	---
Sclérostine	---	---	---	---	---	---	---
Ostéocalcine	---	↘ 71%	---	---	---	---	---
TNF-α	---	---	↘ 66%	↘ 63%	↗ 175%	---	---
PPAR-γ	---	---	---	↘ 50%	---	---	---
C-EBPα	---	---	---	↘ 61%	↗ 98%	---	---
Masse musculaire	↘*	↗*	↘*	---	---	---	↘*
Aire des fibres	↗ 21%	---	---	↗ 43%	---	---	---
Fibre type I	---	↗ 27%	---	↗ 27%	---	---	---
Fibre type II	---	↘ 8%	---	↘ 13%	---	---	---
Densité vasculaire	↘ 20%	↘ 15%	↘ 26%	---	---	---	---
Fibres avec gouttelettes lipidiques	↗↗	---	↗↗	---	---	---	---
Myostatine	---	↗ 102%	---	---	---	---	---
Activine RIIb	---	↗ 994%	---	↗ 936%	---	---	---
Visfatine	---	↗ 196%	↗ 94%	---	---	---	---
FNDC5	---	↗ 746%	---	↗ 388%	---	---	↘ 40%
PPAR-γ	↗ 125%	---	---	---	---	---	---
C-EBPα	---	↗ 827%	↗ 242%	↗ 227%	---	↗ 374%	---
FAT/CD36	↗ 143%	↗ 133%	↗ 196%	---	---	---	---
Irisine	↗ 183%	---	---	---	---	---	---
Visfatine	---	---	---	---	---	---	---
Corticostérone	---	↗ 34%	---	↗ 102%	---	---	---
TNF-α	---	---	---	↘ 76%	---	---	↘ 58%

Si on considère maintenant uniquement les souris OA post-traumatiques, on peut conclure que celles qui ont une obésité MM sont plus atteintes que celles qui ont une obésité M. En effet, l'hypergravité (obésité M) protège le compartiment trabéculaire et maintient le

phénotype musculaire caractéristique de l'exercice en résistance. L'obésité MM, elle, tend à fragiliser l'os cortical et diminue fortement les capacités musculaires des souris arthrosiques. Cette fois encore, les résultats montrent que les troubles métaboliques sont prépondérants.

Enfin, nous avons mené un essai thérapeutique utilisant les vibrations corps entiers comme traitement potentiel des détériorations musculo-squelettiques de l'obésité couplée ou non à l'OA. Tout d'abord, nous n'avons pas observé d'effet sur la sévérité de l'obésité ou de l'arthrose. Un effet musculaire est observé au niveau moléculaire (plus important lorsque l'OA est présente) sans modification des paramètres macroscopiques (aire, typage des fibres). Le système osseux n'a pas été influencé. Ce traitement est donc neutre pour l'os et semble amorcer un effet positif sur le muscle. Clairement les modalités du régime vibratoire ne sont pas encore optimisées.

Tout au long de notre travail, nous avons évalué les réponses de l'appareil musculo-squelettique en tant qu'unité fonctionnelle (unité os/muscle). Mais tous les tissus n'évoluent pas conjointement. Déjà au niveau du squelette, on note des réponses asynchrones entre les compartiments osseux corticaux et trabéculaires. Chez les obèses MM, OA ou non, l'os trabéculaire est préservé, seul l'os cortical est atteint. Chez ces animaux, la perte de masse musculaire est conjointe à la diminution de l'épaisseur corticale. Un dénominateur commun à l'os et au muscle est le défaut de vascularisation et l'invasion graisseuse (adipocytes dans la moelle et stockage lipidique dans les fibres musculaires). Les OA non obèses (OA Ctrl) sont les seuls à présenter une atteinte trabéculaire et une préservation corticale ainsi qu'une augmentation de la résorption ostéoclastique et une inflammation locale (TNF- α osseux augmenté). Encore plus étonnant, les M OA (OA 2g) présentent une augmentation du BV/TV et une diminution de l'épaisseur corticale. Ces résultats indiquent l'importance de mesurer ces deux compartiments séparément, puisqu'ils se comportent comme deux tissus différents. Nous montrons clairement que chez les obèses et/ou arthrosiques c'est l'os cortical qui est le plus sensible. Cependant des études complémentaires seraient nécessaires pour analyser la qualité osseuse : degré de minéralisation, propriété mécanique, teneur en produits de glycation avancée, mécanismes responsables de la modification de la porosité corticale.

Nous avons mis en évidence l'existence d'un phénotype vasculaire marqué au niveau osseux et musculaire chez les animaux obèses (Ob et OA Ob). Il est souvent rapporté que l'obésité

induit une augmentation des acides gras libres circulants et une libération d'adipokines et de cytokines inflammatoires à partir de la graisse viscérale et périvasculaire, ce qui entraîne des modifications structurelles et fonctionnelles de la microvasculature[343]. Nos résultats semblent montrer que même en absence d'une inflammation systémique (TNF- α circulant inchangé), une hypovascularisation intervient dans ces deux tissus. La résistance à l'insuline au sein du muscle squelettique en altérant les voies de signalisation endothéliales eNOS-dépendantes[343], en diminuant les taux d'adiponectine (non vérifié dans notre étude), et en augmentant la lipotoxicité des acides gras excédentaires (IMCL, expressions de PPAR- γ et FAT/CD36 perturbées) génère une altération de la microcirculation. Il a été montré récemment dans des muscles de souris HFD, que l'augmentation du taux de protéines endothéliales FOXO, freine le processus angiogénique et contribue à l'installation d'une résistance à l'insuline musculaire[344]. Les adipocytes périvasculaires ont aussi un rôle majeur dans les propriétés vasomotrices et péri-inflammatoires vasculaires et donc dans la perfusion du muscle[345]. Il a d'ailleurs été montré que l'inflammation précède l'hypoxie, et leurs conséquences sur le profil sécrétoire paracrine de ce tissu adipeux périvasculaire pourraient être pires que dans d'autres tissus adipeux[346]. En tout cas, notre étude montre que l'hypovascularisation est un événement constant dans le muscle squelettique et dans le tissu osseux des animaux obèses. Cette hypovascularisation pourrait avoir des conséquences sur la perfusion des tissus et la progression de l'ischémie. Si les mécanismes musculaires commencent à être décodés[344], il n'en est pas de même au niveau osseux. Or il existe une hétérogénéité phénotypique endothéliale propre à chaque organe. La moelle osseuse possède des capillaires artériolaires mais aussi un endothélium sinusoidal qui échange avec les cellules de la moelle osseuse et les cellules osseuses. Ces cellules endothéliales ont des propriétés particulières de barrière perméable (endothélium fenêtré). Un phénotypage des vaisseaux sanguins de la moelle osseuse de souris obèses et diabétiques reste à faire.

L'exposition chronique à l'hypergravité 2g, qui double le poids corporel, stimule en permanence les muscles, surtout posturaux. D'ailleurs chez les non OA, les muscles s'adaptent comme lors d'un entraînement en résistance alors que l'os ne subit pas de changement. Il se peut que, vu la plasticité musculaire, un temps d'exposition plus long soit nécessaire pour aboutir à des modifications osseuses. Ce phénotype musculaire à 2g est globalement maintenu chez les OA 2g. Les souris 2g (OA ou non OA) augmentent de manière importante

l'expression des marqueurs des voies cataboliques (myostatine et son récepteur Act RIIb) et anaboliques (FNDC5) suggérant que le métabolisme musculaire est activé. Il faudrait analyser dans le temps de quelle façon ces expressions géniques modifient la performance musculaire. Nous avons par ailleurs observé que des souris arthrosiques non obèses qui disposent d'une roue d'activité gagnent en force musculaire. Ces résultats demandent confirmation.

Nous envisageons à court terme d'évaluer l'activité physique des souris dans la centrifugeuse en leur mettant à disposition une roue d'actimétrie (faisabilité réalisée sur quelques animaux), et de mesurer les forces musculaires des membres antérieurs et postérieurs, la posture des souris pouvant être modifiée en hypergravité. Le couplage entre une activité physique, même modeste, et l'hypergravité pourrait générer des effets synergiques efficaces et non nociceptifs.

Notre étude a montré que les souris obèses développent spontanément et de manière reproductible une arthrose du genou. Les cinétiques de dégradation musculo-squelettiques dans ce modèle (sans arthrose traumatique induite) pourraient être déterminées. Ces souris pourraient également être exposées à une hypergravité modérée (<2g afin de ne pas trop augmenter les charges pondérales et diminuer le stress) pour compenser leur fragilité ostéo-musculaire.

En conclusion, l'obésité affecte l'os cortical et le muscle (et préserve l'os trabéculaire) ; l'arthrose post-traumatique accentue ces fragilités. L'os cortical est très réactif, les modifications de la vascularisation et de l'adiposité médullaires n'influençant pas la microstructure trabéculaire. L'hypergravité à 2g n'est pas délétère pour l'os, montrant que ce sont les troubles métaboliques qui priment à ce niveau. L'hypergravité à 2g renforce le muscle même chez les arthrosiques.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] C. Arroyo-Johnson et K. D. Mincey, « Obesity Epidemiology Worldwide », *Gastroenterol. Clin. North Am.*, vol. 45, n° 4, p. 571-579, déc. 2016.
- [2] « Microsoft Word - Diet_overweight and obesity.doc - Diet_overweight_and_obesity.pdf ». .
- [3] K. Kulkarni, T. Karssiens, V. Kumar, et H. Pandit, « Obesity and osteoarthritis », *Maturitas*, vol. 89, p. 22-28, juill. 2016.
- [4] P. Faucher et C. Poitou, « Physiopathologie de l'obésité », *Rev. Rhum. Monogr.*, vol. 83, n° 1, p. 6-12, février 2016.
- [5] D. Gallagher, S. B. Heymsfield, M. Heo, S. A. Jebb, P. R. Murgatroyd, et Y. Sakamoto, « Healthy percentage body fat ranges: an approach for developing guidelines based on body mass index », *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 72, n° 3, p. 694-701, sept. 2000.
- [6] A. H. Kissebah *et al.*, « Relation of body fat distribution to metabolic complications of obesity », *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 54, n° 2, p. 254-260, févr. 1982.
- [7] A. Hruby et F. B. Hu, « The Epidemiology of Obesity: A Big Picture », *PharmacoEconomics*, vol. 33, n° 7, p. 673-689, juill. 2015.
- [8] J. K. van den Heuvel, A. J. van Rozen, R. A. H. Adan, et S. E. la Fleur, « An overview on how components of the melanocortin system respond to different high energy diets », *Eur. J. Pharmacol.*, vol. 660, n° 1, p. 207-212, juin 2011.
- [9] Y. M. Haidar et B. C. Cosman, « Obesity Epidemiology », *Clin. Colon Rectal Surg.*, vol. 24, n° 4, p. 205-210, déc. 2011.
- [10] M.-A. Cornier *et al.*, « The metabolic syndrome », *Endocr. Rev.*, vol. 29, n° 7, p. 777-822, déc. 2008.
- [11] C. L. Boulangé, A. L. Neves, J. Chilloux, J. K. Nicholson, et M.-E. Dumas, « Impact of the gut microbiota on inflammation, obesity, and metabolic disease », *Genome Med.*, vol. 8, avr. 2016.
- [12] S. M. Harakeh *et al.*, « Gut Microbiota: A Contributing Factor to Obesity », *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, vol. 6, août 2016.
- [13] N. A. Berger, « Obesity and cancer pathogenesis », *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 1311, p. 57-76, avr. 2014.
- [14] J. Vendrell *et al.*, « Resistin, adiponectin, ghrelin, leptin, and proinflammatory cytokines: relationships in obesity », *Obes. Res.*, vol. 12, n° 6, p. 962-971, juin 2004.
- [15] A. Koster *et al.*, « Body Fat Distribution and Inflammation Among Obese Older Adults With and Without Metabolic Syndrome », *Obesity*, vol. 18, n° 12, p. 2354-2361, décembre 2010.
- [16] Z. Wang et T. Nakayama, « Inflammation, a link between obesity and cardiovascular disease », *Mediators Inflamm.*, vol. 2010, p. 535918, 2010.
- [17] S. P. Weisberg, D. McCann, M. Desai, M. Rosenbaum, R. L. Leibel, et A. W. Ferrante, « Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue », *J. Clin. Invest.*, vol. 112, n° 12, p. 1796-1808, déc. 2003.
- [18] J. S. Yudkin, M. Kumari, S. E. Humphries, et V. Mohamed-Ali, « Inflammation, obesity, stress and coronary heart disease: is interleukin-6 the link? », *Atherosclerosis*, vol. 148, n° 2, p. 209-214, février 2000.
- [19] Z. Bagi, Z. Broskova, et A. Feher, « Obesity and Coronary Microvascular Disease – Implications for Adipose Tissue-Mediated Remote Inflammatory Response », *Curr. Vasc. Pharmacol.*, vol. 12, n° 3, p. 453-461, mai 2014.
- [20] K. Selthofer-Relatić, I. Bošnjak, et A. Kibel, « Obesity Related Coronary Microvascular Dysfunction: From Basic to Clinical Practice », *Cardiol. Res. Pract.*, vol. 2016, 2016.
- [21] N. Arsenii *et al.*, « Impact of Visceral Obesity on Microvascular Invasion in Hepatocellular Carcinoma », *Cancer Invest.*, vol. 34, n° 6, p. 271-278, juill. 2016.

- [22] L. Zhao *et al.*, « Inflammation-induced microvascular insulin resistance is an early event in diet-induced obesity », *Clin. Sci. Lond. Engl.* 1979, vol. 129, n° 12, p. 1025-1036, déc. 2015.
- [23] C. Li *et al.*, « Oxidative Stress-Related Mechanisms and Antioxidant Therapy in Diabetic Retinopathy », *Oxid. Med. Cell. Longev.*, vol. 2017, 2017.
- [24] Y. Wang et H. Yan, « MicroRNA-126 contributes to Niaspan treatment induced vascular restoration after diabetic retinopathy », *Sci. Rep.*, vol. 6, mai 2016.
- [25] N. A. Berger, « Cancer and Energy Balance, Epidemiology and Overview », .
- [26] D. C. McMillan, N. Sattar, et C. S. McArdle, « Obesity and cancer », *BMJ*, vol. 333, n° 7578, p. 1109-1111, nov. 2006.
- [27] C. Holroyd, C. Cooper, et E. Dennison, « Epidemiology of osteoporosis », *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 22, n° 5, p. 671-685, oct. 2008.
- [28] R. Cherif, L. Vico, N. Laroche, M. Sakly, N. Attia, et C. Lavet, « Dual-energy X-ray absorptiometry underestimates in vivo lumbar spine bone mineral density in overweight rats », *J. Bone Miner. Metab.*, févr. 2017.
- [29] J. E. Compston *et al.*, « Relationship of weight, height, and body mass index with fracture risk at different sites in postmenopausal women: the Global Longitudinal study of Osteoporosis in Women (GLOW) », *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.*, vol. 29, n° 2, p. 487-493, févr. 2014.
- [30] E. Sornay-Rendu, S. Boutroy, N. Vilayphiou, B. Claustrat, et R. D. Chapurlat, « In Obese Postmenopausal Women, Bone Microarchitecture and Strength Are Not Commensurate to Greater Body Weight: The Os des Femmes de Lyon (OFELY) Study », *J. Bone Miner. Res.*, vol. 28, n° 7, p. 1679-1687, juill. 2013.
- [31] C. Caffarelli, C. Alessi, R. Nuti, et S. Gonnelli, « Divergent effects of obesity on fragility fractures », *Clin. Interv. Aging*, vol. 9, p. 1629-1636, 2014.
- [32] J. Compston, « Obesity and fractures in postmenopausal women », *Curr. Opin. Rheumatol.*, vol. 27, n° 4, p. 414-419, juill. 2015.
- [33] L. Zhang *et al.*, « Adiponectin ameliorates experimental periodontitis in diet-induced obesity mice », *PLoS One*, vol. 9, n° 5, p. e97824, 2014.
- [34] B. Roy, M. E. Curtis, L. S. Fears, S. N. Nahashon, et H. M. Fentress, « Molecular Mechanisms of Obesity-Induced Osteoporosis and Muscle Atrophy », *Front. Physiol.*, vol. 7, p. 439, 2016.
- [35] U. T. Iwaniec et R. T. Turner, « Influence of body weight on bone mass, architecture and turnover », *J. Endocrinol.*, vol. 230, n° 3, p. R115-R130, janv. 2016.
- [36] R. N. Baumgartner *et al.*, « Epidemiology of sarcopenia among the elderly in New Mexico », *Am. J. Epidemiol.*, vol. 147, n° 8, p. 755-763, avr. 1998.
- [37] M. Zamboni, G. Mazzali, F. Fantin, A. Rossi, et V. Di Francesco, « Sarcopenic obesity: A new category of obesity in the elderly », *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.*, vol. 18, n° 5, p. 388-395, juin 2008.
- [38] D. Heber, S. Ingles, J. M. Ashley, M. H. Maxwell, R. F. Lyons, et R. M. Elashoff, « Clinical detection of sarcopenic obesity by bioelectrical impedance analysis », *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 64, n° 3 Suppl, p. 472S-477S, sept. 1996.
- [39] A. Kalinkovich et G. Livshits, « Sarcopenic obesity or obese sarcopenia: A cross talk between age-associated adipose tissue and skeletal muscle inflammation as a main mechanism of the pathogenesis », *Ageing Res. Rev.*, vol. 35, p. 200-221, mai 2017.
- [40] C. T. Lutz et L. S. Quinn, « Sarcopenia, obesity, and natural killer cell immune senescence in aging: Altered cytokine levels as a common mechanism », *Aging*, vol. 4, n° 8, p. 535-546, août 2012.
- [41] R. C. Lawrence *et al.*, « Estimates of the prevalence of arthritis and other rheumatic conditions in the United States. Part II », *Arthritis Rheum.*, vol. 58, n° 1, p. 26-35, janv. 2008.
- [42] E. Lespessailles, N. Ibrahim-Nasser, H. Toumi, et R. Chapurlat, « Contribution of high resolution peripheral quantitative CT to the management of bone and joint diseases », *Jt. Bone Spine Rev. Rhum.*, mai 2017.

- [43] Z. Huang et V. B. Kraus, « Does lipopolysaccharide-mediated inflammation have a role in OA? », *Nat. Rev. Rheumatol.*, vol. 12, n° 2, p. 123-129, févr. 2016.
- [44] Z. Cui *et al.*, « Halofuginone attenuates osteoarthritis by inhibition of TGF- β activity and H-type vessel formation in subchondral bone », *Ann. Rheum. Dis.*, vol. 75, n° 9, p. 1714-1721, sept. 2016.
- [45] P. I. Mapp *et al.*, « Angiogenesis in two animal models of osteoarthritis », *Osteoarthritis Cartilage*, vol. 16, n° 1, p. 61-69, janv. 2008.
- [46] C. A. Karvonen-Gutierrez, M. R. Sowers, et S. G. Heeringa, « Sex dimorphism in the association of cardiometabolic characteristics and osteophytes-defined radiographic knee osteoarthritis among obese and non-obese adults: NHANES III », *Osteoarthr. Cartil. OARS Osteoarthr. Res. Soc.*, vol. 20, n° 7, p. 614-621, juill. 2012.
- [47] S. R. Piva, A. M. Susko, S. S. Khoja, D. A. Josbeno, G. K. Fitzgerald, et F. G. S. Toledo, « Links between Osteoarthritis and Diabetes: Implications for Management from a Physical Activity Perspective », *Clin. Geriatr. Med.*, vol. 31, n° 1, p. 67-87, févr. 2015.
- [48] F. Guilak, « Biomechanical factors in osteoarthritis », *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.*, vol. 25, n° 6, p. 815-823, déc. 2011.
- [49] « 1ThepotentialimpactAPJAIVol34No4December2016P249.pdf ». .
- [50] S. F. Clarke *et al.*, « The gut microbiota and its relationship to diet and obesity », *Gut Microbes*, vol. 3, n° 3, p. 186-202, mai 2012.
- [51] P. J. Parekh, E. Arusi, A. I. Vinik, et D. A. Johnson, « The Role and Influence of Gut Microbiota in Pathogenesis and Management of Obesity and Metabolic Syndrome », *Front. Endocrinol.*, vol. 5, avr. 2014.
- [52] C. Sanmiguel, A. Gupta, et E. A. Mayer, « Gut Microbiome and Obesity: A Plausible Explanation for Obesity », *Curr. Obes. Rep.*, vol. 4, n° 2, p. 250-261, juin 2015.
- [53] F. Bäckhed *et al.*, « The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage », *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 101, n° 44, p. 15718-15723, nov. 2004.
- [54] M. Aguirre et K. Venema, « Does the Gut Microbiota Contribute to Obesity? Going beyond the Gut Feeling », *Microorganisms*, vol. 3, n° 2, p. 213-235, avr. 2015.
- [55] M. F. Gregor et G. S. Hotamisligil, « Inflammatory mechanisms in obesity », *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 29, p. 415-445, 2011.
- [56] P. D. Cani *et al.*, « Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance », *Diabetes*, vol. 56, n° 7, p. 1761-1772, juill. 2007.
- [57] Y. Mendizábal, S. Llorens, et E. Nava, « Hypertension in Metabolic Syndrome: Vascular Pathophysiology », *Int. J. Hypertens.*, vol. 2013, 2013.
- [58] T. McLaughlin et G. Reaven, « Insulin resistance and hypertension. Patients in double jeopardy for cardiovascular disease », *Geriatrics*, vol. 55, n° 6, p. 28-32, 35, juin 2000.
- [59] E. Imbalzano *et al.*, « Clinical impact of angiotensin I converting enzyme polymorphisms in subjects with resistant hypertension », *Mol. Cell. Biochem.*, févr. 2017.
- [60] L. te Riet, J. H. M. van Esch, A. J. M. Roks, A. H. van den Meiracker, et A. H. J. Danser, « Hypertension », *Circ. Res.*, vol. 116, n° 6, p. 960-975, mars 2015.
- [61] J. Son, H. Koh, et J. Son, « The association between intraocular pressure and different combination of metabolic syndrome components », *BMC Ophthalmol.*, vol. 16, juin 2016.
- [62] H. Yanai, Y. Tomono, K. Ito, N. Furutani, H. Yoshida, et N. Tada, « The underlying mechanisms for development of hypertension in the metabolic syndrome », *Nutr. J.*, vol. 7, p. 10, avr. 2008.
- [63] H. Ahmadiéh et S. T. Azar, « Type 2 Diabetes Mellitus, Oral Diabetic Medications, Insulin Therapy, and Overall Breast Cancer Risk », *ISRN Endocrinol.*, vol. 2013, janv. 2013.
- [64] Y. Zhu *et al.*, « Cardiac PI3K-Akt Impairs Insulin-Stimulated Glucose Uptake Independent of mTORC1 and GLUT4 Translocation », *Mol. Endocrinol.*, vol. 27, n° 1, p. 172-184, janv. 2013.
- [65] Y. V. Wong, P. Cook, et B. K. Somani, « The Association of Metabolic Syndrome and Urolithiasis », *Int. J. Endocrinol.*, vol. 2015, 2015.

- [66] S. Tangvarasittichai, « Oxidative stress, insulin resistance, dyslipidemia and type 2 diabetes mellitus », *World J. Diabetes*, vol. 6, n° 3, p. 456-480, avr. 2015.
- [67] M. D. Meglasson et F. M. Matschinsky, « Pancreatic islet glucose metabolism and regulation of insulin secretion », *Diabetes. Metab. Rev.*, vol. 2, n° 3-4, p. 163-214, 1986.
- [68] J. Capeau, J.-P. Bastard, et C. Vigouroux, « Syndrome métabolique et insulino-résistance : physiopathologie », *MT Cardio*, vol. 2, n° 2, p. 155-164, mars 2006.
- [69] A. C. Fahed, J. M. Gholmieh, et S. T. Azar, « Connecting the Lines between Hypogonadism and Atherosclerosis », *Int. J. Endocrinol.*, vol. 2012, 2012.
- [70] P.-O. Barrette et A. G. Schwertani, « A closer look at the role of urotensin II in the metabolic syndrome », *Front. Endocrinol.*, vol. 3, déc. 2012.
- [71] U. J. Jung et M.-S. Choi, « Obesity and Its Metabolic Complications: The Role of Adipokines and the Relationship between Obesity, Inflammation, Insulin Resistance, Dyslipidemia and Nonalcoholic Fatty Liver Disease », *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 15, n° 4, p. 6184-6223, avr. 2014.
- [72] G. Boden, « Obesity and Free Fatty Acids (FFA) », *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.*, vol. 37, n° 3, p. 635-ix, sept. 2008.
- [73] Y. Homma, « Predictors of atherosclerosis », *J. Atheroscler. Thromb.*, vol. 11, n° 5, p. 265-270, 2004.
- [74] F. C. McGillicuddy, M. P. Reilly, et D. J. Rader, « Adipose Modulation of High-Density Lipoprotein Cholesterol », *Circulation*, vol. 124, n° 15, p. 1602-1605, oct. 2011.
- [75] W. H. Ettinger, L. A. Miller, T. K. Smith, et J. S. Parks, « Effect of interleukin-1 alpha on lipoprotein lipids in cynomolgus monkeys: comparison to tumor necrosis factor », *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1128, n° 2-3, p. 186-192, oct. 1992.
- [76] Y. Liu, H. Dang, D. Li, W. Pang, B. D. Hammock, et Y. Zhu, « Inhibition of Soluble Epoxide Hydrolase Attenuates High-Fat-Diet-Induced Hepatic Steatosis by Reduced Systemic Inflammatory Status in Mice », *PLoS ONE*, vol. 7, n° 6, juin 2012.
- [77] F. Du, A. Virtue, H. Wang, et X.-F. Yang, « Metabolomic analyses for atherosclerosis, diabetes, and obesity », *Biomark. Res.*, vol. 1, p. 17, avr. 2013.
- [78] K. H. M. Kwok, K. S. L. Lam, et A. Xu, « Heterogeneity of white adipose tissue: molecular basis and clinical implications », *Exp. Mol. Med.*, vol. 48, n° 3, p. e215, mars 2016.
- [79] A. Park, W. K. Kim, et K.-H. Bae, « Distinction of white, beige and brown adipocytes derived from mesenchymal stem cells », *World J. Stem Cells*, vol. 6, n° 1, p. 33-42, janv. 2014.
- [80] J. Y. Huh, Y. J. Park, M. Ham, et J. B. Kim, « Crosstalk between Adipocytes and Immune Cells in Adipose Tissue Inflammation and Metabolic Dysregulation in Obesity », *Mol. Cells*, vol. 37, n° 5, p. 365-371, mai 2014.
- [81] T. Sakurai *et al.*, « The Effects of Exercise Training on Obesity-Induced Dysregulated Expression of Adipokines in White Adipose Tissue », *Int. J. Endocrinol.*, vol. 2013, 2013.
- [82] L. Frederiksen *et al.*, « Subcutaneous rather than visceral adipose tissue is associated with adiponectin levels and insulin resistance in young men », *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 94, n° 10, p. 4010-4015, oct. 2009.
- [83] I. Moreno-Indias *et al.*, « Adipose tissue infiltration in normal-weight subjects and its impact on metabolic function », *Transl. Res. J. Lab. Clin. Med.*, vol. 172, p. 6-17.e3, juin 2016.
- [84] I. K. Lesna *et al.*, « Human adipose tissue accumulation is associated with pro-inflammatory changes in subcutaneous rather than visceral adipose tissue », *Nutr. Diabetes*, vol. 7, n° 4, p. e264, avril 2017.
- [85] J. M. Wentworth *et al.*, « Pro-inflammatory CD11c+CD206+ adipose tissue macrophages are associated with insulin resistance in human obesity », *Diabetes*, vol. 59, n° 7, p. 1648-1656, juill. 2010.
- [86] A. V. B. Castro, C. M. Kolka, S. P. Kim, et R. N. Bergman, « Obesity, insulin resistance and comorbidities – Mechanisms of association », *Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.*, vol. 58, n° 6, p. 600-609, août 2014.

- [87] A. J. Richard et J. M. Stephens, « The role of JAK-STAT signaling in adipose tissue function », *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1842, n° 3, p. 431-439, mars 2014.
- [88] M. Patel *et al.*, « Id1 Promotes Obesity by Suppressing Brown Adipose Thermogenesis and White Adipose Browning », *Diabetes*, p. db161079, mars 2017.
- [89] M. W. Hamrick, M. E. McGee-Lawrence, et D. M. Frechette, « Fatty Infiltration of Skeletal Muscle: Mechanisms and Comparisons with Bone Marrow Adiposity », *Front. Endocrinol.*, vol. 7, p. 69, 2016.
- [90] W. Liu, Y. Liu, X. Lai, et S. Kuang, « Intramuscular adipose is derived from a non-Pax3 lineage and required for efficient regeneration of skeletal muscles », *Dev. Biol.*, vol. 361, n° 1, p. 27-38, janv. 2012.
- [91] M. Mora, « Fibrous-adipose replacement in skeletal muscle biopsy », *Eur. Heart J.*, vol. 10 Suppl D, p. 103-104, sept. 1989.
- [92] S. Schenk, M. Saberi, et J. M. Olefsky, « Insulin sensitivity: modulation by nutrients and inflammation », *J. Clin. Invest.*, vol. 118, n° 9, p. 2992-3002, sept. 2008.
- [93] O. Addison, R. L. Marcus, P. C. Lastayo, et A. S. Ryan, « Intermuscular fat: a review of the consequences and causes », *Int. J. Endocrinol.*, vol. 2014, p. 309570, 2014.
- [94] M. P. Krause *et al.*, « Adiponectin is expressed by skeletal muscle fibers and influences muscle phenotype and function », *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, vol. 295, n° 1, p. C203-212, juill. 2008.
- [95] J. Machann, H. Häring, F. Schick, et M. Stumvoll, « Intramyocellular lipids and insulin resistance », *Diabetes Obes. Metab.*, vol. 6, n° 4, p. 239-248, juill. 2004.
- [96] K. Eckardt, A. Taube, et J. Eckel, « Obesity-associated insulin resistance in skeletal muscle: Role of lipid accumulation and physical inactivity », *Rev. Endocr. Metab. Disord.*, vol. 12, n° 3, p. 163-172, févr. 2011.
- [97] D. Serra, P. Mera, M. I. Malandrino, J. F. Mir, et L. Herrero, « Mitochondrial Fatty Acid Oxidation in Obesity », *Antioxid. Redox Signal.*, vol. 19, n° 3, p. 269-284, juill. 2013.
- [98] T. Lam *et al.*, « Reversal of intramyocellular lipid accumulation by lipophagy and a p62-mediated pathway », *Cell Death Discov.*, vol. 2, p. 16061, août 2016.
- [99] M. Gueugneau *et al.*, « Skeletal muscle lipid content and oxidative activity in relation to muscle fiber type in aging and metabolic syndrome », *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.*, vol. 70, n° 5, p. 566-576, mai 2015.
- [100] S. J. Choi *et al.*, « Intramyocellular Lipid and Impaired Myofiber Contraction in Normal Weight and Obese Older Adults », *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.*, vol. 71, n° 4, p. 557-564, avr. 2016.
- [101] M. Tavassoli, « Marrow adipose cells. Histochemical identification of labile and stable components », *Arch. Pathol. Lab. Med.*, vol. 100, n° 1, p. 16-18, janv. 1976.
- [102] M. E. Kricun, « Red-yellow marrow conversion: its effect on the location of some solitary bone lesions », *Skeletal Radiol.*, vol. 14, n° 1, p. 10-19, 1985.
- [103] H. Cao, K. Gerhold, J. R. Mayers, M. M. Wiest, S. M. Watkins, et G. S. Hotamisligil, « Identification of a lipokine, a lipid hormone linking adipose tissue to systemic metabolism », *Cell*, vol. 134, n° 6, p. 933-944, sept. 2008.
- [104] E. L. Scheller, A. A. Burr, O. A. MacDougald, et W. P. Cawthorn, « Inside out: Bone marrow adipose tissue as a source of circulating adiponectin », *Adipocyte*, vol. 5, n° 3, p. 251-269, sept. 2016.
- [105] E. L. Scheller et C. J. Rosen, « What's the matter with MAT? Marrow adipose tissue, metabolism, and skeletal health », *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 1311, p. 14-30, avr. 2014.
- [106] M. W. Morcos, H. Al-Jallad, et R. Hamdy, « Comprehensive Review of Adipose Stem Cells and Their Implication in Distraction Osteogenesis and Bone Regeneration », *BioMed Res. Int.*, vol. 2015, 2015.
- [107] N. Kawao et H. Kaji, « Interactions between muscle tissues and bone metabolism », *J. Cell. Biochem.*, vol. 116, n° 5, p. 687-695, mai 2015.

- [108] H. Kaji, « Interaction between Muscle and Bone », *J. Bone Metab.*, vol. 21, n° 1, p. 29-40, févr. 2014.
- [109] M. W. Hamrick, « The skeletal muscle secretome: an emerging player in muscle-bone crosstalk », *BoneKEy Rep.*, vol. 1, p. 60, 2012.
- [110] G. Karsenty et E. N. Olson, « Bone and Muscle Endocrine Functions: Unexpected Paradigms of Inter-organ Communication », *Cell*, vol. 164, n° 6, p. 1248-1256, mars 2016.
- [111] J. E. Gunton, C. M. Girgis, P. A. Baldock, et P. Lips, « Bone muscle interactions and vitamin D », *Bone*, vol. 80, p. 89-94, nov. 2015.
- [112] H. M. Frost, « Bone “mass” and the “mechanostat”: a proposal », *Anat. Rec.*, vol. 219, n° 1, p. 1-9, sept. 1987.
- [113] H. M. Frost, « Muscle, bone, and the Utah paradigm: a 1999 overview », *Med. Sci. Sports Exerc.*, vol. 32, n° 5, p. 911-917, mai 2000.
- [114] J. L. Ferretti, G. R. Cointry, R. F. Capozza, et H. M. Frost, « Bone mass, bone strength, muscle–bone interactions, osteopenias and osteoporoses », *Mech. Ageing Dev.*, vol. 124, n° 3, p. 269-279, mars 2003.
- [115] V. Gnyubkin *et al.*, « Effects of chronic hypergravity: from adaptive to deleterious responses in growing mouse skeleton », *J. Appl. Physiol.*, vol. 119, n° 8, p. 908-917, oct. 2015.
- [116] B. Canciani *et al.*, « Effects of long time exposure to simulated micro- and hypergravity on skeletal architecture », *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.*, vol. 51, p. 1-12, nov. 2015.
- [117] L. Vico, O. Barou, N. Laroche, C. Alexandre, et M. H. Lafage-Proust, « Effects of centrifuging at 2g on rat long bone metaphyses », *Eur. J. Appl. Physiol.*, vol. 80, n° 4, p. 360-366, sept. 1999.
- [118] M. Miwa *et al.*, « Effects of hypergravity on proliferation and differentiation of osteoblast-like cells », *Bone Miner.*, vol. 14, n° 1, p. 15-25, juill. 1991.
- [119] A. Nemoto et T. Uemura, « Hypergravity effects on osteoclasts activity », *J. Gravitational Physiol. J. Int. Soc. Gravitational Physiol.*, vol. 7, n° 2, p. P127-128, juill. 2000.
- [120] M. M. Chi, J. K. Manchester, et O. H. Lowry, « Effect of centrifugation at 2G for 14 days on metabolic enzymes of the tibialis anterior and soleus muscles », *Aviat. Space Environ. Med.*, vol. 69, n° 6 Suppl, p. A9-11, juin 1998.
- [121] W. T. Stauber, G. R. Miller, et J. G. Grimmett, « Adaptation of rat gastrocnemius muscles to 2 weeks of centrifugation: myofibers and extracellular matrix », *Aviat. Space Environ. Med.*, vol. 69, n° 6 Suppl, p. A45-48, juin 1998.
- [122] W. D. Martin, « Effects of chronic centrifugation on skeletal muscle fibers in young developing rats », *Aviat. Space Environ. Med.*, vol. 51, n° 5, p. 473-484, mai 1980.
- [123] M. Frey, R. von Känel-Christen, V. Stalder-Navarro, P. J. Duke, E. R. Weibel, et H. Hoppeler, « Effects of long-term hypergravity on muscle, heart and lung structure of mice », *J. Comp. Physiol. [B]*, vol. 167, n° 7, p. 494-501, oct. 1997.
- [124] M. Bojados et M. Jamon, « The long-term consequences of the exposure to increasing gravity levels on the muscular, vestibular and cognitive functions in adult mice », *Behav. Brain Res.*, vol. 264, p. 64-73, mai 2014.
- [125] T. L. Clemens et G. Karsenty, « The osteoblast: an insulin target cell controlling glucose homeostasis », *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.*, vol. 26, n° 4, p. 677-680, avr. 2011.
- [126] M. Ferron *et al.*, « Insulin signaling in osteoblasts integrates bone remodeling and energy metabolism », *Cell*, vol. 142, n° 2, p. 296-308, juill. 2010.
- [127] K. Fulzele *et al.*, « Insulin receptor signaling in osteoblasts regulates postnatal bone acquisition and body composition », *Cell*, vol. 142, n° 2, p. 309-319, juill. 2010.
- [128] C. Riehle et E. D. Abel, « Insulin Signaling and Heart Failure », *Circ. Res.*, vol. 118, n° 7, p. 1151-1169, avr. 2016.
- [129] J. M. Rojas et M. W. Schwartz, « Control of Hepatic Glucose Metabolism by Islet and Brain », *Diabetes Obes. Metab.*, vol. 16, n° 0 1, p. 33-40, sept. 2014.

- [130] V. T. Samuel et G. I. Shulman, « Integrating Mechanisms for Insulin Resistance: Common Threads and Missing Links », *Cell*, vol. 148, n° 5, p. 852-871, mars 2012.
- [131] J.-R. Chen *et al.*, « Obesity reduces bone density associated with activation of PPAR γ and suppression of Wnt/ β -catenin in rapidly growing male rats », *PLoS One*, vol. 5, n° 10, p. e13704, 2010.
- [132] Z. Wang *et al.*, « Effect of advanced glycosylation end products on apoptosis in human adipose tissue-derived stem cells in vitro », *Cell Biosci.*, vol. 5, p. 3, 2015.
- [133] S. N. Pramojane, M. Phimphilai, N. Chattipakorn, et S. C. Chattipakorn, « Possible roles of insulin signaling in osteoblasts », *Endocr. Res.*, vol. 39, n° 4, p. 144-151, 2014.
- [134] B. T. O'Neill, H. P. M. M. Lauritzen, M. F. Hirshman, G. Smyth, L. J. Goodyear, et C. R. Kahn, « Differential Role of Insulin/IGF-1 Receptor Signaling in Muscle Growth and Glucose Homeostasis », *Cell Rep.*, vol. 11, n° 8, p. 1220-1235, mai 2015.
- [135] C. Tagliaferri, Y. Wittrant, M.-J. Davicco, S. Walrand, et V. Coxam, « Muscle and bone, two interconnected tissues », *Ageing Res. Rev.*, vol. 21, p. 55-70, mai 2015.
- [136] B. Roy, « Biomolecular basis of the role of diabetes mellitus in osteoporosis and bone fractures », *World J. Diabetes*, vol. 4, n° 4, p. 101-113, août 2013.
- [137] L. Tian et X. Yu, « Lipid metabolism disorders and bone dysfunction--interrelated and mutually regulated (review) », *Mol. Med. Rep.*, vol. 12, n° 1, p. 783-794, juill. 2015.
- [138] J. Wei et P. Ducey, « Co-dependence of bone and energy metabolisms », *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 503, n° 1, p. 35-40, nov. 2010.
- [139] K. Tanabe, K. Amo-Shiinoki, M. Hatanaka, et Y. Tanizawa, « Interorgan Crosstalk Contributing to β -Cell Dysfunction », *J. Diabetes Res.*, vol. 2017, p. 3605178, 2017.
- [140] H. C. Denroche, F. K. Huynh, et T. J. Kieffer, « The role of leptin in glucose homeostasis », *J. Diabetes Investig.*, vol. 3, n° 2, p. 115-129, mars 2012.
- [141] Z. Yang *et al.*, « Regulation of insulin and leptin signaling by muscle suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3) », *PLoS One*, vol. 7, n° 10, p. e47493, 2012.
- [142] K. Sakuma et A. Yamaguchi, « Sarcopenic obesity and endocrinal adaptation with age », *Int. J. Endocrinol.*, vol. 2013, p. 204164, 2013.
- [143] A. C. McPherron, A. M. Lawler, et S. J. Lee, « Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member », *Nature*, vol. 387, n° 6628, p. 83-90, mai 1997.
- [144] A. C. McPherron et S.-J. Lee, « Suppression of body fat accumulation in myostatin-deficient mice », *J. Clin. Invest.*, vol. 109, n° 5, p. 595-601, mars 2002.
- [145] T. Guo, W. Jou, T. Chanturiya, J. Portas, O. Gavrilova, et A. C. McPherron, « Myostatin inhibition in muscle, but not adipose tissue, decreases fat mass and improves insulin sensitivity », *PLoS One*, vol. 4, n° 3, p. e4937, 2009.
- [146] M. W. Hamrick, « Increased bone mineral density in the femora of GDF8 knockout mice », *Anat. Rec. A. Discov. Mol. Cell. Evol. Biol.*, vol. 272A, n° 1, p. 388-391, mai 2003.
- [147] J. Dong, Y. Dong, Y. Dong, F. Chen, W. E. Mitch, et L. Zhang, « Inhibition of myostatin in mice improves insulin sensitivity via irisin-mediated cross talk between muscle and adipose tissues », *Int. J. Obes. 2005*, vol. 40, n° 3, p. 434-442, mars 2016.
- [148] H. Amthor *et al.*, « Follistatin complexes Myostatin and antagonises Myostatin-mediated inhibition of myogenesis », *Dev. Biol.*, vol. 270, n° 1, p. 19-30, juin 2004.
- [149] H. Gilson, O. Schakman, S. Kalista, P. Lause, K. Tsuchida, et J.-P. Thissen, « Follistatin induces muscle hypertrophy through satellite cell proliferation and inhibition of both myostatin and activin », *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, vol. 297, n° 1, p. E157-164, juill. 2009.
- [150] M. Eijken *et al.*, « The activin A-follistatin system: potent regulator of human extracellular matrix mineralization », *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.*, vol. 21, n° 11, p. 2949-2960, sept. 2007.
- [151] P. V. Sepulveda *et al.*, « Evaluation of follistatin as a therapeutic in models of skeletal muscle atrophy associated with denervation and tenotomy », *Sci. Rep.*, vol. 5, p. 17535, déc. 2015.

- [152] B. Dankbar *et al.*, « Myostatin is a direct regulator of osteoclast differentiation and its inhibition reduces inflammatory joint destruction in mice », *Nat. Med.*, vol. 21, n° 9, p. 1085-1090, sept. 2015.
- [153] M. R. Laurent *et al.*, « Muscle-bone interactions: From experimental models to the clinic? A critical update », *Mol. Cell. Endocrinol.*, vol. 432, p. 14-36, sept. 2016.
- [154] Y.-S. Chen *et al.*, « GDF8 inhibits bone formation and promotes bone resorption in mice », *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, vol. 44, n° 4, p. 500-508, avril 2017.
- [155] H. Kaji, « Effects of myokines on bone », *BoneKEy Rep.*, vol. 5, p. 826, 2016.
- [156] B. Buehring et N. Binkley, « Myostatin – The Holy Grail for Muscle, Bone, and Fat? », *Curr. Osteoporos. Rep.*, vol. 11, n° 4, p. 407-414, décembre 2013.
- [157] D. L. Allen, D. S. Hittel, et A. C. McPherron, « Expression and Function of Myostatin in Obesity, Diabetes, and Exercise Adaptation », *Med. Sci. Sports Exerc.*, vol. 43, n° 10, p. 1828-1835, oct. 2011.
- [158] « Inhibiting myostatin signaling prevents femoral trabecular bone loss and microarchitecture deterioration in diet-induced obese rats ». [En ligne]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4935442/>. [Consulté le: 27-oct-2016].
- [159] P. Bialek *et al.*, « A myostatin and activin decoy receptor enhances bone formation in mice », *Bone*, vol. 60, p. 162-171, mars 2014.
- [160] R. C. Smith et B. K. Lin, « Myostatin inhibitors as therapies for muscle wasting associated with cancer and other disorders », *Curr. Opin. Support. Palliat. Care*, vol. 7, n° 4, p. 352-360, nov. 2013.
- [161] K. A. Reardon, J. Davis, R. M. Kapsa, P. Choong, et E. Byrne, « Myostatin, insulin-like growth factor-1, and leukemia inhibitory factor mRNAs are upregulated in chronic human disuse muscle atrophy », *Muscle Nerve*, vol. 24, n° 7, p. 893-899, juill. 2001.
- [162] D. F. Sun, Y. Chen, et R. Rabkin, « Work-induced changes in skeletal muscle IGF-1 and myostatin gene expression in uremia », *Kidney Int.*, vol. 70, n° 3, p. 453-459, août 2006.
- [163] Y. Elkina, S. von Haehling, S. D. Anker, et J. Springer, « The role of myostatin in muscle wasting: an overview », *J. Cachexia Sarcopenia Muscle*, vol. 2, n° 3, p. 143-151, sept. 2011.
- [164] D. S. Hittel, J. R. Berggren, J. Shearer, K. Boyle, et J. A. Houmard, « Increased secretion and expression of myostatin in skeletal muscle from extremely obese women », *Diabetes*, vol. 58, n° 1, p. 30-38, janv. 2009.
- [165] H. Q. Han et W. E. Mitch, « Targeting the Myostatin Signaling Pathway to Treat Muscle Wasting Diseases », *Curr. Opin. Support. Palliat. Care*, vol. 5, n° 4, p. 334-341, déc. 2011.
- [166] D. Akhmedov et R. Berdeaux, « The effects of obesity on skeletal muscle regeneration », *Front. Physiol.*, vol. 4, p. 371, 2013.
- [167] B. K. Pedersen et M. A. Febbraio, « Muscles, exercise and obesity: skeletal muscle as a secretory organ », *Nat. Rev. Endocrinol.*, vol. 8, n° 8, p. 457-465, août 2012.
- [168] A. C. Dilger, M. E. Spurlock, A. L. Grant, et D. E. Gerrard, « Myostatin null mice respond differently to dietary-induced and genetic obesity », *Anim. Sci. J. Nihon Chikusan Gakkaiho*, vol. 81, n° 5, p. 586-593, oct. 2010.
- [169] C. Zhang *et al.*, « Myostatin-deficient mice exhibit reduced insulin resistance through activating the AMP-activated protein kinase signalling pathway », *Diabetologia*, vol. 54, n° 6, p. 1491-1501, févr. 2011.
- [170] F. Li, Y. Li, Y. Duan, C.-A. A. Hu, Y. Tang, et Y. Yin, « Myokines and adipokines: Involvement in the crosstalk between skeletal muscle and adipose tissue », *Cytokine Growth Factor Rev.*, vol. 33, p. 73-82, février 2017.
- [171] P. Boström *et al.*, « A PGC1 α -dependent myokine that drives browning of white fat and thermogenesis », *Nature*, vol. 481, n° 7382, p. 463-468, janv. 2012.
- [172] R. A. Vaughan *et al.*, « Characterization of the metabolic effects of irisin on skeletal muscle in vitro », *Diabetes Obes. Metab.*, vol. 16, n° 8, p. 711-718, août 2014.

- [173] Y. Zhang *et al.*, « Irisin exerts dual effects on browning and adipogenesis of human white adipocytes », *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.*, vol. 311, n° 2, p. E530-E541, août 2016.
- [174] J. I. Castillo-Quan, « From white to brown fat through the PGC-1 α -dependent myokine irisin: implications for diabetes and obesity », *Dis. Model. Mech.*, vol. 5, n° 3, p. 293-295, mai 2012.
- [175] G. Colaianni *et al.*, « The myokine irisin increases cortical bone mass », *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 112, n° 39, p. 12157-12162, sept. 2015.
- [176] G. Colaianni *et al.*, « Irisin prevents and restores bone loss and muscle atrophy in hind-limb suspended mice », *Sci. Rep.*, vol. 7, n° 1, p. 2811, juin 2017.
- [177] S. Gao, Y. Cheng, L. Zhao, Y. Chen, et Y. Liu, « The relationships of irisin with bone mineral density and body composition in PCOS patients », *Diabetes Metab. Res. Rev.*, vol. 32, n° 4, p. 421-428, mai 2016.
- [178] J. Shao, Z. Wang, T. Yang, H. Ying, Y. Zhang, et S. Liu, « Bone Regulates Glucose Metabolism as an Endocrine Organ through Osteocalcin », *Int. J. Endocrinol.*, vol. 2015, 2015.
- [179] M. P. Jedrychowski *et al.*, « Detection and Quantitation of Circulating Human Irisin by Tandem Mass Spectrometry », *Cell Metab.*, vol. 22, n° 4, p. 734-740, oct. 2015.
- [180] M. Ferron, E. Hinoi, G. Karsenty, et P. Ducy, « 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.*, vol. 105, n° 13, p. 5266-5270, avr. 2008.
- [181] I. Kanazawa, « Osteocalcin as a hormone regulating glucose metabolism », *World J. Diabetes*, vol. 6, n° 18, p. 1345-1354, déc. 2015.
- [182] M. Ferron, M. D. McKee, R. L. Levine, P. Ducy, et G. Karsenty, « INTERMITTENT INJECTIONS OF OSTEOCALCIN IMPROVE GLUCOSE METABOLISM AND PREVENT TYPE 2 DIABETES IN MICE », *Bone*, vol. 50, n° 2, p. 568-575, févr. 2012.
- [183] D. Chen *et al.*, « HIF-1 α inhibits Wnt signaling pathway by activating Sost expression in osteoblasts », *PLoS One*, vol. 8, n° 6, p. e65940, 2013.
- [184] N. Warde, « Osteoarthritis: Sclerostin inhibits Wnt signaling in OA chondrocytes and protects against inflammation-induced cartilage damage », *Nat. Rev. Rheumatol.*, vol. 7, n° 8, p. 438, juill. 2011.
- [185] N. Kamiya *et al.*, « BMP signaling negatively regulates bone mass through sclerostin by inhibiting the canonical Wnt pathway », *Dev. Camb. Engl.*, vol. 135, n° 22, p. 3801-3811, nov. 2008.
- [186] P. Mera *et al.*, « Osteocalcin Signaling in Myofibers Is Necessary and Sufficient for Optimum Adaptation to Exercise », *Cell Metab.*, vol. 23, n° 6, p. 1078-1092, juin 2016.
- [187] K. Brooks, « Sarcopenia and Increased Body Fat in Sclerostin-deficient Mice: Interactions between Muscle and Bone and Potential Implications for Osteoporosis Management » Penn State Hershey Medical Report » .
- [188] G. Colaianni et M. Grano, « Role of Irisin on the bone-muscle functional unit », *BoneKEy Rep.*, vol. 4, p. 765, 2015.
- [189] G. Daniele *et al.*, « Sclerostin and Insulin Resistance in Prediabetes: Evidence of a Cross Talk Between Bone and Glucose Metabolism », *Diabetes Care*, vol. 38, n° 8, p. 1509-1517, août 2015.
- [190] M. Á. Gómez-Sámano *et al.*, « Fibroblast growth factor 21 and its novel association with oxidative stress », *Redox Biol.*, vol. 11, p. 335-341, déc. 2016.
- [191] F. L. Mashili *et al.*, « Direct effects of FGF21 on glucose uptake in human skeletal muscle: implications for type 2 diabetes and obesity », *Diabetes Metab. Res. Rev.*, vol. 27, n° 3, p. 286-297, mars 2011.
- [192] A. O. Chavez, M. Molina-Carrion, M. A. Abdul-Ghani, F. Folli, R. A. DeFronzo, et D. Tripathy, « Circulating Fibroblast Growth Factor-21 Is Elevated in Impaired Glucose Tolerance and Type 2 Diabetes and Correlates With Muscle and Hepatic Insulin Resistance », *Diabetes Care*, vol. 32, n° 8, p. 1542, août 2009.

- [193] J. Y. Jeon *et al.*, « Association between insulin resistance and impairment of FGF21 signal transduction in skeletal muscles », *Endocrine*, vol. 53, n° 1, p. 97-106, juill. 2016.
- [194] P. Lee *et al.*, « Irisin and FGF21 Are Cold-Induced Endocrine Activators of Brown Fat Function in Humans », *Cell Metab.*, vol. 19, n° 2, p. 302-309, février 2014.
- [195] D. Cuevas-Ramos et C. A. Aguilar-Salinas, « Modulation of energy balance by fibroblast growth factor 21 », *Horm. Mol. Biol. Clin. Investig.*, juin 2016.
- [196] J. S. Moyers *et al.*, « Molecular determinants of FGF-21 activity—synergy and cross-talk with PPAR γ signaling », *J. Cell. Physiol.*, vol. 210, n° 1, p. 1-6, janv. 2007.
- [197] M. Giralt, A. Gavalda-Navarro, et F. Villarroya, « Fibroblast growth factor-21, energy balance and obesity », *Mol. Cell. Endocrinol.*, vol. 418, Part 1, p. 66-73, décembre 2015.
- [198] M. Pi et L. D. Quarles, « Novel Bone Endocrine Networks Integrating Mineral and Energy Metabolism », *Curr. Osteoporos. Rep.*, vol. 11, n° 4, p. 391-399, déc. 2013.
- [199] M. C. Hu, K. Shiizaki, M. Kuro-o, et O. W. Moe, « Fibroblast Growth Factor 23 and Klotho: Physiology and Pathophysiology of an Endocrine Network of Mineral Metabolism », *Annu. Rev. Physiol.*, vol. 75, p. 503-533, 2013.
- [200] M. Wojcik, D. Janus, K. Dolezal-Oltarzewska, D. Drozd, K. Sztefko, et J. B. Starzyk, « The association of FGF23 levels in obese adolescents with insulin sensitivity », *J. Pediatr. Endocrinol. Metab. JPEM*, vol. 25, n° 7-8, p. 687-690, 2012.
- [201] M. A. I. Mirza, A. Larsson, H. Melhus, L. Lind, et T. E. Larsson, « Serum intact FGF23 associate with left ventricular mass, hypertrophy and geometry in an elderly population », *Atherosclerosis*, vol. 207, n° 2, p. 546-551, déc. 2009.
- [202] D.-J. Li, H. Fu, T. Zhao, M. Ni, et F.-M. Shen, « Exercise-stimulated FGF23 promotes exercise performance via controlling the excess reactive oxygen species production and enhancing mitochondrial function in skeletal muscle », *Metabolism.*, vol. 65, n° 5, p. 747-756, mai 2016.
- [203] M. A. I. Mirza, A. Larsson, L. Lind, et T. E. Larsson, « Circulating fibroblast growth factor-23 is associated with vascular dysfunction in the community », *Atherosclerosis*, vol. 205, n° 2, p. 385-390, août 2009.
- [204] X. Hu *et al.*, « Associations of serum fibroblast growth factor 23 levels with obesity and visceral fat accumulation », *Clin. Nutr. Edinb. Scotl.*, déc. 2016.
- [205] J. P. Whitehead, A. A. Richards, I. J. Hickman, G. A. Macdonald, et J. B. Prins, « Adiponectin—a key adipokine in the metabolic syndrome », *Diabetes Obes. Metab.*, vol. 8, n° 3, p. 264-280, mai 2006.
- [206] H. S. Berner *et al.*, « Adiponectin and its receptors are expressed in bone-forming cells », *Bone*, vol. 35, n° 4, p. 842-849, oct. 2004.
- [207] A. E. Achari et S. K. Jain, « Adiponectin, a Therapeutic Target for Obesity, Diabetes, and Endothelial Dysfunction », *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 18, n° 6, juin 2017.
- [208] G. Singhal *et al.*, « Fibroblast Growth Factor 21 (FGF21) Protects against High Fat Diet Induced Inflammation and Islet Hyperplasia in Pancreas », *PLoS ONE*, vol. 11, n° 2, févr. 2016.
- [209] C. Weyer *et al.*, « Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia », *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 86, n° 5, p. 1930-1935, mai 2001.
- [210] C. A. Aguilar-Salinas *et al.*, « High adiponectin concentrations are associated with the metabolically healthy obese phenotype », *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 93, n° 10, p. 4075-4079, oct. 2008.
- [211] A. Onat, G. Hergenç, D. Dursunoğlu, Z. Küçükdurmaz, S. Bulur, et G. Can, « Relatively high levels of serum adiponectin in obese women, a potential indicator of anti-inflammatory dysfunction: relation to sex hormone-binding globulin », *Int. J. Biol. Sci.*, vol. 4, n° 4, p. 208-214, 2008.
- [212] L. Rossmeislová *et al.*, « Weight Loss Improves the Adipogenic Capacity of Human Preadipocytes and Modulates Their Secretory Profile », *Diabetes*, vol. 62, n° 6, p. 1990-1995, juin 2013.

- [213] M. J. Kim, M. Maachi, J. Capeau, et J.-P. Bastard, « Adiponectine et syndrome métabolique », *Immuno-Anal. Biol. Spéc.*, vol. 21, n° 1, p. 1-7, février 2006.
- [214] X. Mao *et al.*, « APPL1 binds to adiponectin receptors and mediates adiponectin signalling and function », *Nat. Cell Biol.*, vol. 8, n° 5, p. 516-523, mai 2006.
- [215] Q. Tu *et al.*, « Adiponectin inhibits osteoclastogenesis and bone resorption via APPL1-mediated suppression of Akt1 », *J. Biol. Chem.*, vol. 286, n° 14, p. 12542-12553, avr. 2011.
- [216] D. Kajimura *et al.*, « Adiponectin regulates bone mass via opposite central and peripheral mechanisms through FoxO1 », *Cell Metab.*, vol. 17, n° 6, p. 901-915, juin 2013.
- [217] H. W. Lee, S. Y. Kim, A. Y. Kim, E. J. Lee, J.-Y. Choi, et J. B. Kim, « Adiponectin stimulates osteoblast differentiation through induction of COX2 in mesenchymal progenitor cells », *Stem Cells Dayt. Ohio*, vol. 27, n° 9, p. 2254-2262, sept. 2009.
- [218] K. E. Barbour *et al.*, « The effects of adiponectin and leptin on changes in bone mineral density », *Osteoporos. Int. J. Establ. Result Coop. Eur. Found. Osteoporos. Natl. Osteoporos. Found. USA*, vol. 23, n° 6, p. 1699-1710, juin 2012.
- [219] Y. Liu et G. Sweeney, « Adiponectin action in skeletal muscle », *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 28, n° 1, p. 33-41, janv. 2014.
- [220] H. S. El-Abhar et M. F. Schaalán, « Phytotherapy in diabetes: Review on potential mechanistic perspectives », *World J. Diabetes*, vol. 5, n° 2, p. 176-197, avr. 2014.
- [221] L. Zhao *et al.*, « Globular adiponectin ameliorates metabolic insulin resistance via AMPK-mediated restoration of microvascular insulin responses », *J. Physiol.*, vol. 593, n° Pt 17, p. 4067, sept. 2015.
- [222] A. Fukuhara *et al.*, « Visfatin: a protein secreted by visceral fat that mimics the effects of insulin », *Science*, vol. 307, n° 5708, p. 426-430, janv. 2005.
- [223] S. S. Sonoli, S. Shivprasad, C. V. B. Prasad, A. B. Patil, P. B. Desai, et M. S. Somannavar, « Visfatin--a review », *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.*, vol. 15, n° 1, p. 9-14, janv. 2011.
- [224] A. R. Moschen, S. Geiger, R. Gerner, et H. Tilg, « Pre-B cell colony enhancing factor/NAMPT/visfatin and its role in inflammation-related bone disease », *Mutat. Res.*, vol. 690, n° 1-2, p. 95-101, août 2010.
- [225] H. Xie *et al.*, « Insulin-Like Effects of Visfatin on Human Osteoblasts », *Calcif. Tissue Int.*, vol. 80, n° 3, p. 201-210, mars 2007.
- [226] K. M. Choi, J. H. Kim, G. J. Cho, S. H. Baik, H. S. Park, et S. M. Kim, « Effect of exercise training on plasma visfatin and eotaxin levels », *Eur. J. Endocrinol.*, vol. 157, n° 4, p. 437-442, oct. 2007.
- [227] R. R. Banerjee et M. A. Lazar, « Resistin: molecular history and prognosis », *J. Mol. Med. Berl. Ger.*, vol. 81, n° 4, p. 218-226, avr. 2003.
- [228] L. Thommesen *et al.*, « Expression and regulation of resistin in osteoblasts and osteoclasts indicate a role in bone metabolism », *J. Cell. Biochem.*, vol. 99, n° 3, p. 824-834, oct. 2006.
- [229] G. Lombardi, F. Sanchis-Gomar, S. Perego, V. Sansoni, et G. Banfi, « Implications of exercise-induced adipo-myokines in bone metabolism », *Endocrine*, vol. 54, n° 2, p. 284-305, nov. 2016.
- [230] S. B. Jørgensen *et al.*, « Oligomeric resistin impairs insulin and AICAR-stimulated glucose uptake in mouse skeletal muscle by inhibiting GLUT4 translocation », *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, vol. 297, n° 1, p. E57-66, juill. 2009.
- [231] R. Palanivel et G. Sweeney, « Regulation of fatty acid uptake and metabolism in L6 skeletal muscle cells by resistin », *FEBS Lett.*, vol. 579, n° 22, p. 5049-5054, sept. 2005.
- [232] P. Muñoz-Cánoves, C. Scheele, B. K. Pedersen, et A. L. Serrano, « Interleukin-6 myokine signaling in skeletal muscle: a double-edged sword? », *FEBS J.*, vol. 280, n° 17, p. 4131-4148, sept. 2013.

- [233] S. Kaneshiro *et al.*, « IL-6 negatively regulates osteoblast differentiation through the SHP2/MEK2 and SHP2/Akt2 pathways in vitro », *J. Bone Miner. Metab.*, vol. 32, n° 4, p. 378-392, juill. 2014.
- [234] W. Feng *et al.*, « Long-Term Administration of High-Fat Diet Corrects Abnormal Bone Remodeling in the Tibiae of Interleukin-6-Deficient Mice », *J. Histochem. Cytochem.*, vol. 64, n° 1, p. 42-53, janv. 2016.
- [235] T. T. Wang, C. Q. He, et X. J. Yu, « Pro-Inflammation Cytokines: New Potential Therapeutic Targets for Obesity-Related Bone Disorders », *Curr. Drug Targets*, janv. 2017.
- [236] M. E. Starr, M. Saito, B. M. Evers, et H. Saito, « Age-Associated Increase in Cytokine Production During Systemic Inflammation—II: The Role of IL-1 β in Age-Dependent IL-6 Upregulation in Adipose Tissue », *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.*, vol. 70, n° 12, p. 1508-1515, déc. 2015.
- [237] K. Asadullah, W. Sterry, et H. D. Volk, « Interleukin-10 Therapy—Review of a New Approach », *Pharmacol. Rev.*, vol. 55, n° 2, p. 241-269, juin 2003.
- [238] F. DRIESSLER, K. VENSTROM, R. SABAT, K. ASADULLAH, et A. J. SCHOTTELIUS, « Molecular mechanisms of interleukin-10-mediated inhibition of NF- κ B activity: a role for p50 », *Clin. Exp. Immunol.*, vol. 135, n° 1, p. 64-73, janv. 2004.
- [239] H.-H. Shin, J.-E. Lee, E. A. Lee, B. S. Kwon, et H.-S. Choi, « Enhanced osteoclastogenesis in 4-1BB-deficient mice caused by reduced interleukin-10 », *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.*, vol. 21, n° 12, p. 1907-1912, déc. 2006.
- [240] T.-W. Kyung, J.-E. Lee, T. V. Phan, R. Yu, et H.-S. Choi, « Osteoclastogenesis by Bone Marrow-Derived Macrophages Is Enhanced in Obese Mice », *J. Nutr.*, vol. 139, n° 3, p. 502-506, janv. 2009.
- [241] C. N. Lumeng, J. L. Bodzin, et A. R. Saltiel, « Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization », *J. Clin. Invest.*, vol. 117, n° 1, p. 175-184, janv. 2007.
- [242] S. Amar, Q. Zhou, Y. Shaik-Dasthagirisahab, et S. Leeman, « Diet-induced obesity in mice causes changes in immune responses and bone loss manifested by bacterial challenge », *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 104, n° 51, p. 20466-20471, déc. 2007.
- [243] H.-J. Kim *et al.*, « Differential effects of interleukin-6 and -10 on skeletal muscle and liver insulin action in vivo », *Diabetes*, vol. 53, n° 4, p. 1060-1067, avr. 2004.
- [244] E.-G. Hong *et al.*, « Interleukin-10 prevents diet-induced insulin resistance by attenuating macrophage and cytokine response in skeletal muscle », *Diabetes*, vol. 58, n° 11, p. 2525-2535, nov. 2009.
- [245] K. Makki, P. Froguel, et I. Wolowczuk, « Adipose Tissue in Obesity-Related Inflammation and Insulin Resistance: Cells, Cytokines, and Chemokines », *ISRN Inflamm.*, vol. 2013, déc. 2013.
- [246] J.-H. Kim *et al.*, « Regulation of the catabolic cascade in osteoarthritis by the zinc-ZIP8-MTF1 axis », *Cell*, vol. 156, n° 4, p. 730-743, févr. 2014.
- [247] K. Kobayashi *et al.*, « Tumor Necrosis Factor α Stimulates Osteoclast Differentiation by a Mechanism Independent of the Odf/Rankl–Rank Interaction », *J. Exp. Med.*, vol. 191, n° 2, p. 275-286, janv. 2000.
- [248] A. Fanzani, V. M. Conraads, F. Penna, et W. Martinet, « Molecular and cellular mechanisms of skeletal muscle atrophy: an update », *J. Cachexia Sarcopenia Muscle*, vol. 3, n° 3, p. 163-179, sept. 2012.
- [249] D.-T. Wang *et al.*, « Resveratrol prevents TNF- α -induced muscle atrophy via regulation of Akt/mTOR/FoxO1 signaling in C2C12 myotubes », *Int. Immunopharmacol.*, vol. 19, n° 2, p. 206-213, avr. 2014.
- [250] G. Sabio *et al.*, « Role of muscle c-Jun NH2-terminal kinase 1 in obesity-induced insulin resistance », *Mol. Cell. Biol.*, vol. 30, n° 1, p. 106-115, janv. 2010.
- [251] Y. Cao, « Angiogenesis modulates adipogenesis and obesity », *J. Clin. Invest.*, vol. 117, n° 9, p. 2362-2368, sept. 2007.

- [252] G. Voros, E. Maquoi, D. Demeulemeester, N. Clerx, D. Collen, et H. R. Lijnen, « Modulation of Angiogenesis during Adipose Tissue Development in Murine Models of Obesity », *Endocrinology*, vol. 146, n° 10, p. 4545-4554, oct. 2005.
- [253] Y. Cao, « Angiogenesis and Vascular Functions in Modulation of Obesity, Adipose Metabolism, and Insulin Sensitivity », *Cell Metab.*, vol. 18, n° 4, p. 478-489, oct. 2013.
- [254] T. R. McGuire *et al.*, « Inflammation Associated With Obesity: Relationship With Blood and Bone Marrow Endothelial Cells », *Obesity*, vol. 19, n° 11, p. 2130-2136, nov. 2011.
- [255] M. Silvennoinen *et al.*, « High-fat feeding induces angiogenesis in skeletal muscle and activates angiogenic pathways in capillaries », *Angiogenesis*, vol. 16, n° 2, p. 297-307, oct. 2012.
- [256] Y. Bhattarai *et al.*, « High-fat diet-induced obesity alters nitric oxide-mediated neuromuscular transmission and smooth muscle excitability in the mouse distal colon », *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, vol. 311, n° 2, p. G210-220, août 2016.
- [257] S. Suri, S. E. Gill, S. M. de Camin, D. Wilson, D. F. McWilliams, et D. A. Walsh, « Neurovascular invasion at the osteochondral junction and in osteophytes in osteoarthritis », *Ann. Rheum. Dis.*, vol. 66, n° 11, p. 1423-1428, nov. 2007.
- [258] S. S. Glasson, T. J. Blanchet, et E. A. Morris, « The surgical destabilization of the medial meniscus (DMM) model of osteoarthritis in the 129/SvEv mouse », *Osteoarthr. Cartil. OARS Osteoarthr. Res. Soc.*, vol. 15, n° 9, p. 1061-1069, sept. 2007.
- [259] M. Pasqualini *et al.*, « Skeletal site-specific effects of whole body vibration in mature rats: from deleterious to beneficial frequency-dependent effects », *Bone*, vol. 55, n° 1, p. 69-77, juill. 2013.
- [260] R. D. Prisby, M.-H. Lafage-Proust, L. Malaval, A. Belli, et L. Vico, « Effects of whole body vibration on the skeleton and other organ systems in man and animal models: what we know and what we need to know », *Ageing Res. Rev.*, vol. 7, n° 4, p. 319-329, déc. 2008.
- [261] R. M. J. Deacon, « Measuring the Strength of Mice », *J. Vis. Exp. JoVE*, n° 76, juin 2013.
- [262] B. Roche *et al.*, « Structure and quantification of microvascularisation within mouse long bones: what and how should we measure? », *Bone*, vol. 50, n° 1, p. 390-399, janv. 2012.
- [263] H. Huang, J. D. Skelly, D. C. Ayers, et J. Song, « Age-dependent Changes in the Articular Cartilage and Subchondral Bone of C57BL/6 Mice after Surgical Destabilization of Medial Meniscus », *Sci. Rep.*, vol. 7, p. 42294, févr. 2017.
- [264] M. R. Fernandes, N. V. de Lima, K. S. Rezende, I. C. M. Santos, I. S. Silva, et R. de C. A. Guimarães, « Animal models of obesity in rodents. An integrative review », *Acta Cir. Bras.*, vol. 31, n° 12, p. 840-844, déc. 2016.
- [265] A. Heydemann, « An Overview of Murine High Fat Diet as a Model for Type 2 Diabetes Mellitus », *J. Diabetes Res.*, vol. 2016, p. 2902351, 2016.
- [266] R. Burcelin, V. Crivelli, A. Dacosta, A. Roy-Tirelli, et B. Thorens, « Heterogeneous metabolic adaptation of C57BL/6J mice to high-fat diet », *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.*, vol. 282, n° 4, p. E834-E842, avr. 2002.
- [267] Y. Wang, C. Wang, X. Zhang, H. F. Gu, et L. Wu, « Common drugs for stabilization of renal function in the progression of diabetic nephropathy and their relations with hypertension therapy », *Curr. Diabetes Rev.*, févr. 2017.
- [268] P. Lindström, « The physiology of obese-hyperglycemic mice [ob/ob mice] », *ScientificWorldJournal*, vol. 7, p. 666-685, mai 2007.
- [269] B. Lecka-Czernik, L. A. Stechschulte, P. J. Czernik, et A. R. Dowling, « High bone mass in adult mice with diet-induced obesity results from a combination of initial increase in bone mass followed by attenuation in bone formation; implications for high bone mass and decreased bone quality in obesity », *Mol. Cell. Endocrinol.*, janv. 2015.
- [270] H. S. Choi, S. J. Park, Z. H. Lee, et S.-K. Lim, « The Effects of a High Fat Diet Containing Diacylglycerol on Bone in C57BL/6J Mice », *Yonsei Med. J.*, vol. 56, n° 4, p. 951-960, juill. 2015.

- [271] E. L. Scheller *et al.*, « Changes in Skeletal Integrity and Marrow Adiposity during High-Fat Diet and after Weight Loss », *Front. Endocrinol.*, vol. 7, p. 102, 2016.
- [272] A. A. Loredó-Pérez *et al.*, « High-fat diet exacerbates pain-like behaviors and periarticular bone loss in mice with CFA-induced knee arthritis », *Obes. Silver Spring Md*, vol. 24, n° 5, p. 1106-1115, mai 2016.
- [273] Y. Fujita, K. Watanabe, et K. Maki, « Serum leptin levels negatively correlate with trabecular bone mineral density in high-fat diet-induced obesity mice », *J. Musculoskelet. Neuronal Interact.*, vol. 12, n° 2, p. 84-94, juin 2012.
- [274] C. R. Doucette *et al.*, « A High Fat Diet Increases Bone Marrow Adipose Tissue (MAT) But Does Not Alter Trabecular or Cortical Bone Mass in C57BL/6J Mice », *J. Cell. Physiol.*, févr. 2015.
- [275] L. Shu *et al.*, « High-fat Diet Causes Bone Loss in Young Mice by Promoting Osteoclastogenesis through Alteration of the Bone Marrow Environment », *Calcif. Tissue Int.*, vol. 96, n° 4, p. 313-323, avr. 2015.
- [276] T. H. Ambrosi *et al.*, « Adipocyte Accumulation in the Bone Marrow during Obesity and Aging Impairs Stem Cell-Based Hematopoietic and Bone Regeneration », *Cell Stem Cell*, vol. 20, n° 6, p. 771-784.e6, juin 2017.
- [277] S. V. da Silva, M. Renovato-Martins, C. Ribeiro-Pereira, M. Citelli, et C. Barja-Fidalgo, « Obesity modifies bone marrow microenvironment and directs bone marrow mesenchymal cells to adipogenesis », *Obesity*, vol. 24, n° 12, p. 2522-2532, déc. 2016.
- [278] G. Kerckhofs *et al.*, « Changes in bone macro- and microstructure in diabetic obese mice revealed by high resolution microfocus X-ray computed tomography », *Sci. Rep.*, vol. 6, p. 35517, oct. 2016.
- [279] D. D. Sosa et E. F. Eriksen, « Reduced Bone Material Strength is Associated with Increased Risk and Severity of Osteoporotic Fractures. An Impact Microindentation Study », *Calcif. Tissue Int.*, vol. 101, n° 1, p. 34-42, juill. 2017.
- [280] M. Ferron et J. Lacombe, « Regulation of energy metabolism by the skeleton: Osteocalcin and beyond », *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 561, p. 137-146, nov. 2014.
- [281] U. Saleem, T. H. Mosley, et I. J. Kullo, « Serum Osteocalcin Is Associated With Measures of Insulin Resistance, Adipokine Levels, and the Presence of Metabolic Syndrome », *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 30, n° 7, p. 1474-1478, juill. 2010.
- [282] J. N. Stabley, R. D. Prisby, B. J. Behnke, et M. D. Delp, « Type 2 diabetes alters bone and marrow blood flow and vascular control mechanisms in the ZDF rat », *J. Endocrinol.*, vol. 225, n° 1, p. 47-58, avr. 2015.
- [283] I. Elias *et al.*, « Adipose Tissue Overexpression of Vascular Endothelial Growth Factor Protects Against Diet-Induced Obesity and Insulin Resistance », *Diabetes*, vol. 61, n° 7, p. 1801-1813, juill. 2012.
- [284] Z. S. Ai-Aql, A. S. Alagl, D. T. Graves, L. C. Gerstenfeld, et T. A. Einhorn, « Molecular mechanisms controlling bone formation during fracture healing and distraction osteogenesis », *J. Dent. Res.*, vol. 87, n° 2, p. 107-118, févr. 2008.
- [285] S. Lillioja *et al.*, « Skeletal muscle capillary density and fiber type are possible determinants of in vivo insulin resistance in man », *J. Clin. Invest.*, vol. 80, n° 2, p. 415-424, août 1987.
- [286] H. Eshima *et al.*, « Long-term, but not short-term high-fat diet induces fiber composition changes and impaired contractile force in mouse fast-twitch skeletal muscle », *Physiol. Rep.*, vol. 5, n° 7, avr. 2017.
- [287] M. Mogi *et al.*, « Diabetic mice exhibited a peculiar alteration in body composition with exaggerated ectopic fat deposition after muscle injury due to anomalous cell differentiation », *J. Cachexia Sarcopenia Muscle*, vol. 7, n° 2, p. 213-224, mai 2016.
- [288] Y. Komiya *et al.*, « Mouse soleus (slow) muscle shows greater intramyocellular lipid droplet accumulation than EDL (fast) muscle: fiber type-specific analysis », *J. Muscle Res. Cell Motil.*, mars 2017.

- [289] K. E. Shortreed *et al.*, « Muscle-specific adaptations, impaired oxidative capacity and maintenance of contractile function characterize diet-induced obese mouse skeletal muscle », *PLoS One*, vol. 4, n° 10, p. e7293, oct. 2009.
- [290] D. L. Allen *et al.*, « Myostatin, activin receptor IIb, and follistatin-like-3 gene expression are altered in adipose tissue and skeletal muscle of obese mice », *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, vol. 294, n° 5, p. E918-927, mai 2008.
- [291] N. Kubota *et al.*, « PPAR gamma mediates high-fat diet-induced adipocyte hypertrophy and insulin resistance », *Mol. Cell*, vol. 4, n° 4, p. 597-609, oct. 1999.
- [292] A. W. Norris *et al.*, « Muscle-specific PPAR γ -deficient mice develop increased adiposity and insulin resistance but respond to thiazolidinediones », *J. Clin. Invest.*, vol. 112, n° 4, p. 608-618, août 2003.
- [293] R. M. Evans, G. D. Barish, et Y.-X. Wang, « PPARs and the complex journey to obesity », *Nat. Med.*, vol. 10, n° 4, p. 355-361, avr. 2004.
- [294] M. Ahmadian *et al.*, « PPAR γ signaling and metabolism: the good, the bad and the future », *Nat. Med.*, vol. 9, n° 5, p. 557-566, mai 2013.
- [295] B. Lee *et al.*, « C/EBP α regulates macrophage activation and systemic metabolism », *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, vol. 306, n° 10, p. E1144-1154, mai 2014.
- [296] G. J. Darlington, S. E. Ross, et O. A. MacDougald, « The Role of C/EBP Genes in Adipocyte Differentiation », *J. Biol. Chem.*, vol. 273, n° 46, p. 30057-30060, nov. 1998.
- [297] K. Krüger *et al.*, « Functional and muscular adaptations in an experimental model for isometric strength training in mice », *PLoS One*, vol. 8, n° 11, p. e79069, 2013.
- [298] P. M. Fuller, K. M. Baldwin, et C. A. Fuller, « Parallel and divergent adaptations of rat soleus and plantaris to chronic exercise and hypergravity », *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, vol. 290, n° 2, p. R442-448, févr. 2006.
- [299] I. Girard et T. Garland, « Plasma corticosterone response to acute and chronic voluntary exercise in female house mice », *J. Appl. Physiol. Bethesda Md 1985*, vol. 92, n° 4, p. 1553-1561, avr. 2002.
- [300] N. Kawao, H. Morita, K. Obata, Y. Tamura, K. Okumoto, et H. Kaji, « The vestibular system is critical for the changes in muscle and bone induced by hypergravity in mice », *Physiol. Rep.*, vol. 4, n° 19, oct. 2016.
- [301] T. M. Gotoh, N. Fujiki, T. Matsuda, S. Gao, et H. Morita, « Roles of baroreflex and vestibulosympathetic reflex in controlling arterial blood pressure during gravitational stress in conscious rats », *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, vol. 286, n° 1, p. R25-30, janv. 2004.
- [302] S. Buscemi, D. Corleo, C. Buscemi, et C. Giordano, « Does iris(in) bring bad news or good news? », *Eat. Weight Disord. EWD*, sept. 2017.
- [303] Z. Yang, X. Chen, Y. Chen, et Q. Zhao, « Decreased irisin secretion contributes to muscle insulin resistance in high-fat diet mice », *Int. J. Clin. Exp. Pathol.*, vol. 8, n° 6, p. 6490-6497, juin 2015.
- [304] B. L. Guilford, J. C. Parson, C. W. Grote, S. N. Vick, J. M. Ryals, et D. E. Wright, « Increased FNDC5 is associated with insulin resistance in high fat-fed mice », *Physiol. Rep.*, vol. 5, n° 13, juill. 2017.
- [305] G. Sesti *et al.*, « High circulating irisin levels are associated with insulin resistance and vascular atherosclerosis in a cohort of nondiabetic adult subjects », *Acta Diabetol.*, vol. 51, n° 5, p. 705-713, oct. 2014.
- [306] B. García-Fontana *et al.*, « Relationship between myostatin and irisin in type 2 diabetes mellitus: a compensatory mechanism to an unfavourable metabolic state? », *Endocrine*, vol. 52, n° 1, p. 54-62, avr. 2016.
- [307] N. M. Al-Daghri *et al.*, « Habitual physical activity is associated with circulating irisin in healthy controls but not in subjects with diabetes mellitus type 2 », *Eur. J. Clin. Invest.*, vol. 45, n° 8, p. 775-781, août 2015.

- [308] T. Kurdiova *et al.*, « Effects of obesity, diabetes and exercise on Fndc5 gene expression and irisin release in human skeletal muscle and adipose tissue: in vivo and in vitro studies », *J. Physiol.*, vol. 592, n° 5, p. 1091-1107, mars 2014.
- [309] J.-J. Liu *et al.*, « Lower circulating irisin is associated with type 2 diabetes mellitus », *J. Diabetes Complications*, vol. 27, n° 4, p. 365-369, août 2013.
- [310] Y.-K. Choi *et al.*, « Serum irisin levels in new-onset type 2 diabetes », *Diabetes Res. Clin. Pract.*, vol. 100, n° 1, p. 96-101, avr. 2013.
- [311] R. Alis *et al.*, « Association between irisin and homocysteine in euglycemic and diabetic subjects », *Clin. Biochem.*, vol. 47, n° 18, p. 333-335, déc. 2014.
- [312] M. Forouzanfar *et al.*, « Fndc5 overexpression facilitated neural differentiation of mouse embryonic stem cells », *Cell Biol. Int.*, vol. 39, n° 5, p. 629-637, mai 2015.
- [313] A. Roca-Rivada *et al.*, « FNDC5/irisin is not only a myokine but also an adipokine », *PLoS One*, vol. 8, n° 4, p. e60563, 2013.
- [314] B. M. Varela-Rodríguez, L. Pena-Bello, P. Juiz-Valiña, B. Vidal-Bretal, F. Cordido, et S. Sangiao-Alvarellos, « FNDC5 expression and circulating irisin levels are modified by diet and hormonal conditions in hypothalamus, adipose tissue and muscle », *Sci. Rep.*, vol. 6, p. 29898, juill. 2016.
- [315] Y. Tsuchiya, D. Ando, K. Takamatsu, et K. Goto, « Resistance exercise induces a greater irisin response than endurance exercise », *Metabolism.*, vol. 64, n° 9, p. 1042-1050, sept. 2015.
- [316] J. Y. Huh, V. Mougios, A. Skraparlis, A. Kabasakalis, et C. S. Mantzoros, « Irisin in response to acute and chronic whole-body vibration exercise in humans », *Metabolism*, vol. 63, n° 7, p. 918-921, juill. 2014.
- [317] T. M. Griffin *et al.*, « Diet-induced obesity differentially regulates behavioral, biomechanical, and molecular risk factors for osteoarthritis in mice », *Arthritis Res. Ther.*, vol. 12, n° 4, p. R130, 2010.
- [318] T. Pitcher, J. Sousa-Valente, et M. Malcangio, « The Monoiodoacetate Model of Osteoarthritis Pain in the Mouse », *J. Vis. Exp. JoVE*, n° 111, mai 2016.
- [319] Y. Higuchi *et al.*, « Conditional knockdown of hyaluronidase 2 in articular cartilage stimulates osteoarthritic progression in a mice model », *Sci. Rep.*, vol. 7, n° 1, p. 7028, août 2017.
- [320] E. L. Radin et R. M. Rose, « Role of subchondral bone in the initiation and progression of cartilage damage », *Clin. Orthop.*, n° 213, p. 34-40, déc. 1986.
- [321] S. Kyostio-Moore *et al.*, « STR/ort mice, a model for spontaneous osteoarthritis, exhibit elevated levels of both local and systemic inflammatory markers », *Comp. Med.*, vol. 61, n° 4, p. 346-355, août 2011.
- [322] C. V. Manion, U. Hochgeschwender, A. B. Edmundson, T. E. Hugli, et C. R. Gabaglia, « Dietary aspartyl-phenylalanine-1-methyl ester delays osteoarthritis and prevents associated bone loss in STR/ORT mice », *Rheumatol. Oxf. Engl.*, vol. 50, n° 7, p. 1244-1249, juill. 2011.
- [323] R. A. Mooney, E. R. Sampson, J. Lerea, R. N. Rosier, et M. J. Zuscik, « High-fat diet accelerates progression of osteoarthritis after meniscal/ligamentous injury », *Arthritis Res. Ther.*, vol. 13, n° 6, p. R198, 2011.
- [324] B. Poulet *et al.*, « Time-series transcriptional profiling yields new perspectives on susceptibility to murine osteoarthritis », *Arthritis Rheum.*, vol. 64, n° 10, p. 3256-3266, oct. 2012.
- [325] T. Matsumoto *et al.*, « The influence of sex on the chondrogenic potential of muscle-derived stem cells: implications for cartilage regeneration and repair », *Arthritis Rheum.*, vol. 58, n° 12, p. 3809-3819, déc. 2008.
- [326] M.-C. Laiguillon *et al.*, « Expression and function of visfatin (Nampt), an adipokine-enzyme involved in inflammatory pathways of osteoarthritis », *Arthritis Res. Ther.*, vol. 16, n° 1, p. R38, janv. 2014.
- [327] P. Das Neves Borges, T. L. Vincent, et M. Marenzana, « Automated assessment of bone changes in cross-sectional micro-CT studies of murine experimental osteoarthritis », *PLoS ONE*, vol. 12, n° 3, mars 2017.

- [328] C. Slemenda *et al.*, « Quadriceps weakness and osteoarthritis of the knee », *Ann. Intern. Med.*, vol. 127, n° 2, p. 97-104, juill. 1997.
- [329] V. Kuptniratsaikul, O. Tosayanonda, S. Nilganuwong, et V. Thamalikitkul, « The efficacy of a muscle exercise program to improve functional performance of the knee in patients with osteoarthritis », *J. Med. Assoc. Thai. Chotmaihet Thangphaet*, vol. 85, n° 1, p. 33-40, janv. 2002.
- [330] K. R. Vincent et H. K. Vincent, « Resistance Exercise for Knee Osteoarthritis », *PM R*, vol. 4, n° 5 0, p. S45-S52, mai 2012.
- [331] C. Rubin, G. Xu, et S. Judex, « The anabolic activity of bone tissue, suppressed by disuse, is normalized by brief exposure to extremely low-magnitude mechanical stimuli », *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.*, vol. 15, n° 12, p. 2225-2229, oct. 2001.
- [332] C.-C. Huang, T.-L. Tseng, W.-C. Huang, Y.-H. Chung, H.-L. Chuang, et J.-H. Wu, « Whole-body vibration training effect on physical performance and obesity in mice », *Int. J. Med. Sci.*, vol. 11, n° 12, p. 1218-1227, 2014.
- [333] D. M. Frechette, D. Krishnamoorthy, T. Pamon, M. E. Chan, V. Patel, et C. T. Rubin, « Mechanical signals protect stem cell lineage selection, preserving the bone and muscle phenotypes in obesity », *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, sept. 2017.
- [334] G. J. Kerr *et al.*, « C57BL/6 mice are resistant to joint degeneration induced by whole-body vibration », *Osteoarthritis Cartilage*.
- [335] Y. K. Luu *et al.*, « Mechanical stimulation of mesenchymal stem cell proliferation and differentiation promotes osteogenesis while preventing dietary-induced obesity », *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.*, vol. 24, n° 1, p. 50-61, janv. 2009.
- [336] B. Y. Chan *et al.*, « Increased chondrocyte sclerostin may protect against cartilage degradation in osteoarthritis », *Osteoarthritis Cartilage*, vol. 19, n° 7, p. 874-885, juill. 2011.
- [337] W. Bouaziz *et al.*, « Loss of sclerostin promotes osteoarthritis in mice via β -catenin-dependent and -independent Wnt pathways », *Arthritis Res. Ther.*, vol. 17, n° 1, 2015.
- [338] M. M. Weivoda, S. J. Youssef, et M. J. Oursler, « Sclerostin expression and functions beyond the osteocyte », *Bone*, vol. 96, n° Supplement C, p. 45-50, mars 2017.
- [339] J. Wu, L. Ma, L. Wu, et Q. Jin, « Wnt- β -catenin signaling pathway inhibition by sclerostin may protect against degradation in healthy but not osteoarthritic cartilage », *Mol. Med. Rep.*, vol. 15, n° 5, p. 2423-2432, mai 2017.
- [340] M. R. McCann *et al.*, « Whole-body vibration of mice induces articular cartilage degeneration with minimal changes in subchondral bone », *Osteoarthritis Cartilage*, vol. 25, n° 5, p. 770-778, mai 2017.
- [341] W. L. Murfee *et al.*, « High-frequency, low-magnitude vibrations suppress the number of blood vessels per muscle fiber in mouse soleus muscle », *J. Appl. Physiol. Bethesda Md 1985*, vol. 98, n° 6, p. 2376-2380, juin 2005.
- [342] G. Ceccarelli *et al.*, « Low-amplitude high frequency vibration down-regulates myostatin and atrogin-1 expression, two components of the atrophy pathway in muscle cells », *J. Tissue Eng. Regen. Med.*, vol. 8, n° 5, p. 396-406, mai 2014.
- [343] K. Lemaster, D. Jackson, D. Goldman, et J. C. Frisbee, « Insidious incrementalism: The silent failure of the microcirculation with increasing peripheral vascular disease risk », *Microcirc. N. Y. N 1994*, vol. 24, n° 2, févr. 2017.
- [344] E. Nwadozi *et al.*, « Endothelial FoxO proteins impair insulin sensitivity and restrain muscle angiogenesis in response to a high-fat diet », *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.*, vol. 30, n° 9, p. 3039-3052, sept. 2016.
- [345] R. I. Meijer *et al.*, « Perivascular adipose tissue control of insulin-induced vasoreactivity in muscle is impaired in db/db mice », *Diabetes*, vol. 62, n° 2, p. 590-598, févr. 2013.
- [346] T. K. Chatterjee *et al.*, « Proinflammatory phenotype of perivascular adipocytes: influence of high-fat feeding », *Circ. Res.*, vol. 104, n° 4, p. 541-549, févr. 2009.

ANNEXES

Annexe 1 Composition de la nourriture Sniff

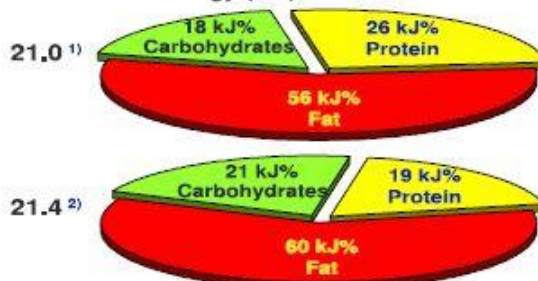
ssniff® EF acc. D12492 (II) mod. *

Experimental diet for rats and mice, very high fat content (tallow) / DIO series

Description

The experimental diet is characterized by extremely high amounts of fat and low (original) cholesterol contents. However, the cholesterol concentration and the fat source (fatty acids) can be individually adjusted to the scientific question or to the experimental design. Because that diet has the highest fat content among the DIO series (diet induced obesity) the feed will quickly induce obesity and promotes the development of diabetes type 2 (NIDDM) as well as atherosclerotic lesions (plaques) in the cardiovascular system. The feeding period until first clinical symptoms might be observed depends largely on the rat or mouse strain and the previous dietary history (fat supply).

Crude Nutrients	[%]	Energy	[MJ/kg]
Dry matter	94.0	Gross Energy (GE)	24.4
Crude protein (N x 6,25)	24.1	Metabolizable Energy (ME)	
Crude fat	34.6		
Crude fibre	6.0	21.0 ¹⁾	
Crude ash	6.1		
N free extracts	23.3		
Starch	0.5		
Sugar	9.5		
Dextrin	15.3		



¹⁾ ME calculated according to the pig formula, Annex 4 of the German feed regulation

²⁾ ME calculated with the Atwater factors

Minerals	[%]	Amino acids	[%]	Vitamins	per kg
Calcium	0.98	Lysine	1.98	Vitamin A	15,000 IU
Phosphorus	0.65	Methionine	0.83	Vitamin D ₃	1,500 IU
Sodium	0.20	Cystine	0.46	Vitamin E	150 mg
Magnesium	0.17	Met+Cys	1.28	Vitamin K (as menadione)	20 mg
Potassium	0.98	Threonine	1.07	Vitamin C	30 mg
		Tryptophan	0.31	Thiamin (B ₁)	16 mg
Fatty acids	[%]	Arginine	0.88	Riboflavin (B ₂)	16 mg
C 8:0	—	Histidine	0.76	Pyridoxine (B ₆)	18 mg
C 10:0	—	Valine	1.64	Cobalamin (B ₁₂)	30 µg
C 12:0	0.03	Isoleucine	1.25	Nicotinic acid	45 mg
C 14:0	1.03	Leucine	2.36	Pantothenic acid	55 mg
C 16:0	8.06	Phenylalanine	1.29	Folic acid	19 mg
C 16:1	0.78	Phe+Tyr	2.57	Biotin	310 µg
C 17:0	0.38	Glycine	0.50	Choline-Chloride	2,300 mg
C 18:0	5.61	Glutamic acid	5.41	Inositol	80 mg
C 18:1	12.13	Aspartic acid	1.79	Trace elements	per kg
C 18:2	2.37	Proline	2.76	Iron	139 mg
C 18:3	0.33	Alanine	0.79	Manganese	82 mg
C 20:0	0.04	Serine	1.43	Zinc	56 mg
C 20:1	0.01			Copper	12 mg
C 20:4	0.07			Iodine	0.97 mg
C 20:5	—			Selenium	0.13 mg
C 22:6	—			Cobalt	0.13 mg

Cholesterol [mg/kg] 290
(original content)

Feed composition
On request

Production and sale

ssniff Spezialdiäten GmbH
Phone: +49-(0)2921-9658-0
Fax: +49-(0)2921-9658-40
E-Mail: mail@ssniff.de
www.ssniff.de / www.ssniff.com

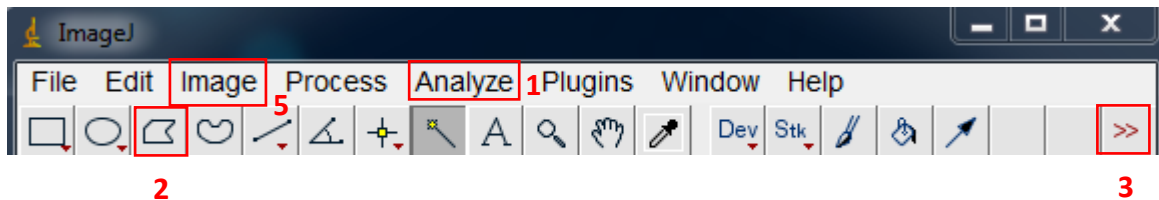
Main products

E15741-30 Meal / Powder
E15741-34 10 mm pellets

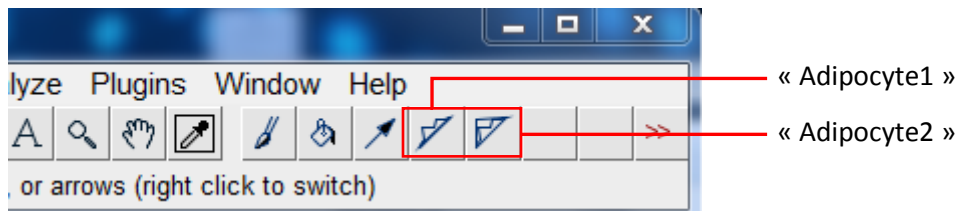
* Research Diets Inc.

Annexe 2 : Plugins adipocytes

- Installer les macros « Adipocyte 1 » et « Adipocyte 2 » dans :
C:\Program Files\ImageJ\macros\toolsets



- Ouvrir l'image très contrasté (SafranineO/FastGreen) dans Image J (Glisser/déposer)
- Rentrer l'échelle de l'image prise au DMRB : Analyze → Set Scale... (1)
 - X1.6 : 1mm = 216.667 pixels
 - X5 : 1mm = 680 pixels
 - X10 : 1mm = 1370 pixels
 - X20 : 1mm = 2744 pixels
- Tracer la ROI (2)
- Comptabiliser manuellement les adipocytes et rentrer la valeur dans un fichier excel
- Vérifier que la Roi est toujours tracée
- Charger les macros « Adipocyte 1 » et « Adipocyte 2 » (3), celles-ci apparaissent dans



le menu (4)

- Lancer la macro « Adipocyte1 » (Descriptif en annexe 1)
- L'aire totale de la ROI apparait dans une nouvelle fenêtre « Results » colonne « Area » : Récupérer cette valeur dans un tableau excel (4)
- Ajuster le seuillage sur le tissu osseux : Image → Adjust → Threshold... → Apply (5)
- Lancer la macro « Adipocyte2 » (Descriptif en annexe 2)
- L'aire totale du tissu osseux apparait dans une nouvelle fenêtre « Summary » colonne « Total Area » : Récupérer cette valeur dans un tableau excel
- La soustraction de l'aire osseuse à l'aire totale nous donne l'aire médullaire
- Le nombre d'adipocyte rapporté a l'aire médullaire nous donne une densité adipocytaire médullaire

Plugin « Adipocyte1 »

```
macro "Adipocyte1 Action Tool - C037L0ff0G0e2b157581c1f000" { → Nom de la macro  
run("Add to Manager"); } Enregistre la ROI dans le gestionnaire de ROI  
roiManager("Add");  
run("Measure"); → Mesure l'aire totale de la ROI  
run("Split Channels"); → Sépare les différents canaux (Rouge, bleu, vert)  
close(); → Ferme la fenêtre active  
close(); → Ferme la fenêtre active  
run("Invert"); → Inverse les niveaux de gris  
roiManager("Deselect"); → Désélectionne la ROI  
roiManager("Select", 0); → Sélectionne la première ROI  
run("Crop"); → Coupe l'extérieur de la ROI  
run("Clear Outside"); → Supprime les niveaux de gris à l'extérieur de la ROI  
//run("Threshold..."); → Pré-seuillage  
}
```

Plugin « Adipocyte2 »

```
macro "Adipocyte2 Action Tool -C037L0ff0G0e2b157581c1f001" { → Nom de la macro  
setOption("BlackBackground", true); → Fond noir  
run("Convert to Mask"); → Ouvre une fenêtre des éléments quantifiés  
run("Analyze Particles...", "show=Outlines display clear summarize"); → Analyse des  
particules  
roiManager("Deselect"); → Désélectionne la ROI  
roiManager("Select", 0); → Sélectionne la première ROI  
roiManager("Measure"); → Mesure l'aire totale de la ROI  
}
```

Cartilage score (Grade Osteoarthritic damage):

- 0 = normal**
- 0.5 = Loss of Safranin-O without structural changes**
- 1 = Small fibrillations**
- 2 = Vertical clefts down to the layer immediately below the superficial layer and some loss of surface lamina**
- 3= Vertical clefts/erosion to the calcified cartilage extending to <25% of the articular surface**
- 4= Vertical clefts/erosion to the calcified cartilage extending to 25-50% of the articular surface**
- 5= Vertical clefts/erosion to the calcified cartilage extending to 50-75% of the articular surface**
- 6= Vertical clefts/erosion to the calcified cartilage extending to >75% of the articular surface**

Annexe 4 : Comptage des ostéoclastes

Le comptage des ostéoclastes se fait sur des lames avec une coloration TRAP. Pour débiter, il faut allumer l'ordinateur, le microscope et la table de comptage (à droite de l'ordinateur). Pour la table de comptage, le bouton on/off est derrière à gauche. La table de comptage doit avoir un voyant vert allumé et la souris dessus doit avoir un voyant rouge.

- Ouvrir le logiciel Morphométrie.
- Rentrer vos Initiales et faire OK. Si vous n'avez pas encore de fichier personnel faire OK à la seconde fenêtre. Si vous avez déjà un fichier sélectionné le et faite ouvrir (cela permettra d'enregistrer tous votre travail au même endroit).
- Choisissez x20 dans grossissement objectifs.
- Dans Paramètres -> Animal puis entrer.
- Rentrer le BV/TV et le Tb Th précédemment calculé grâce au logiciel Bone (ordinateur à côté de celui-ci à droite). Faire OK.
- Cliquer ensuite sur le bouton Résorption. Une page blanche s'affiche. Vous pouvez compter.
- Placer la lame à compter sous le microscope. Mettre l'objectif 20 en place.
- L'oculaire gauche présente un rectangle qui permet de délimiter la zone de comptage. Placer cette zone là où vous voulez débiter le comptage.
- Pour déplacer la Zone déplacer la lame.
- Pour compter les ostéoclastes, utiliser la souris sur la table de comptage.
- Visualiser le point rouge dans les oculaires.
- Pour compter un ostéoclaste (violet) mettre le point rouge sur une des extrémités puis appuyer sur le bouton jaune et maintenir jusqu'à la fin de l'ostéoclaste puis relâcher. Apparaît alors la mesure sur l'ordinateur.
- Faire cela pour tous les ostéoclastes de la zone. Puis appuyez sur le bouton Vert et changer de zone. Et ainsi de suite.
- Une fois toutes les zones terminées appuyez deux fois sur le bouton blanc. Un résumé des données apparaît sur l'ordinateur. Récupérez sur papier :
 - o Le nombre de champs
 - o Le nombre d'ostéoclastes
 - o Le N Oc/B Ar
 - o Le N Oc/B Pm
 - o Le Ocs/BS
 - o Le Oc/Le
- Refaire la même chose pour la mesure suivante en reprenant à Paramètre -> Animal

Annexe 5 : Mesure de la minéralisation

Le comptage de la minéralisation se fait sur des lames blanches. Pour débuter, il faut allumer l'ordinateur, le microscope et la table de comptage (à droite de l'ordinateur). Pour la table de comptage, le bouton on/off est derrière à gauche. La table de comptage doit avoir un voyant vert allumé et la souris dessus doit avoir un voyant rouge.

- Ouvrir le logiciel Morphométrie.
- Rentrer vos Initiales et faire OK. Si vous n'avez pas encore de fichier personnel faire OK à la seconde fenêtre. Si vous avez déjà un fichier sélectionné le et faite ouvrir (cela permettra d'enregistrer tous votre travail au même endroit).
- Choisissez x20 dans grossissement objectifs.
- Dans Paramètres -> Animal puis entrer.
- Rentrer le BV/TV et le Tb Th précédemment calculé sur les lames TRAP grâce au logiciel Bone (ordinateur à côté de celui-ci à droite). Faire OK.
- Cliquer ensuite sur le bouton Surfaces Marquées. Une page blanche s'affiche. Vous pouvez compter.
- Placer la lame à compter sous le microscope. Mettre l'objectif 20 en place.
- Pour compter la minéralisation, utiliser la souris sur la table de comptage.
- Visualiser le point rouge dans les oculaires.
- Pour compter mettre le point rouge sur une des extrémités du marquage (simple = bouton jaune et double = bouton blanc) puis appuyer sur le bouton et maintenir jusqu'à la fin du marquage puis relâcher. Apparaît alors la mesure sur l'ordinateur.
- Faire cela pour tous les marquages de la zone.
- Une fois terminées appuyez deux fois sur le bouton vert. Un résumé des données apparaît sur l'ordinateur. Récupérez sur papier :
 - o sLS/BS
 - o dLS/BS
- Sur la même lame mesurer la vitesse de minéralisation (Epaisseur -> Vitesse de minéralisation)
- Rentrer le nombre de jours entre les 2 injections de Tétracycline (ici 5)
- Pour mesurer l'épaisseur faire un clic (bouton jaune) sur chacun des deux traits du double marquage.
- Une fois terminées appuyez deux fois sur le bouton vert. Un résumé des données apparaît sur l'ordinateur. Récupérez sur papier :
 - o MAR
 - o MAR $\pi/4$

Annexe 6 : Inclusion des muscles en OCT

- Préparer les moules (DiaPath Tissue dispmolds plastics 15*15*6 mm) et papier alu en avance avec les identifiants des muscles de chaque souris (moules plastiques non coupés).
- Mettre de l'OCT (VWR colle tissue OCT Q Path pour congélation, 125ml, ref 00411243) au fond des moules sans faire de bulles.
- Déposer le muscle en suivant la longueur du moule et toujours dans le même sens.
- Recouvrir la biopsie d'OCT jusqu'au rebord du moule en essayant de ne pas faire de bulles et d'être le plus plat possible.
- Dans le 1er bac : prendre la cassette d'inclusion avec une pince et poser horizontalement à la surface de l'azote. Lorsque le fond de l'OCT "a pris", il devient blanc. La cassette peut être lâché au fond du bac d'azote. Bien Vérifier que la cassette plonge complètement dans l'azote.
- Faire cela avec l'ensemble des inclusions de la première souris. Ensuite récupérer les cassettes au fond du 1er bac et les emballer dans leur papier alu correspondant qui sont replongés aussitôt dans le 2ème bac d'azote en attendant la fin de l'expérimentation et le stockage à -80°C.

Attention ne pas se contenter de jeter tes cassettes + alu dans le 2ème bac, il faut remuer de temps en temps l'azote pour être sûr qu'elles immergent complètement dans le liquide surtout quand tu commences à avoir beaucoup de moules incluses.

- Le 1er bac d'azote est donc vide et prêt pour la souris suivante et ainsi de suite.

Conseil :

En procédant ainsi la place sera suffisante dans le 1er bac pour ne pas être gêné par les cassettes déjà incluses. Cela réduit le risque d'avoir des bulles à la surface du bloc.

Les bulles a la surface proviennent d'une part de bulle déjà présente lorsque le muscle est recouvert et d'autre part de la plongée non contrôlée du muscle dans l'azote.

Les bulles se formant à la surface du bloc ne sont pas gênantes pour les coupes si le muscle est quand même complètement enrobé donc protégé et que la quantité d'OCT est suffisante.

Protocole écrit d'après les informations et techniques utilisées par Stéphanie CHANON du laboratoire CARMEN de Lyon.

Annexe 7 : Extraction et purification

EXTRACTION

Phase de séparation

- Sortir les tubes du congèle et les faire décongeler 5 min minimum
- Pour les os récupérer le TRI Reagent et rincer avec 4 ml de cette même solution.
- Pour les muscles, le volume est déjà de 5 ml
- Ajouter 200µL de CHCl₃ (*pour 1 ml de TRI Reagent au départ*)
- Vortexer
- Incuber 2-3 min. à TA
- Centrifuger 15-20 min. à 10000g (12000g max) à 4°C
- Récupérer la phase aqueuse supérieure contenant les ARN dans un tube propre

Précipitation de l'ARN et lavages

- Ajouter 500 µL d'isopropanol (*pour 1 ml de TRI Reagent au départ*)
- Vortexer
- Incuber 20 min. à TA (ou O/N à -20°C)
- Centrifuger 20 min. à 10000g (12000g max) à 4°C
- Eliminer le surnageant
- Laver le culot d'ARN avec 1 ml d'EtOH 70% (2 fois)
- Vortexer
- Centrifuger 15 min. à 10000g à 4°C
- Eliminer le surnageant
- Sécher le culot à TA

Dissolution de l'ARN

- Reprendre dans 50 µL H₂O RNase-free
- Incuber 5 min. à 55°C
- Vortexer
- Centrifuger à 1000g quelques secondes pour faire descendre toutes les gouttes

Test de la quantité d'ARN

- Placer 196 µL/puits d'H₂O Rnase free dans la plaque 96 puits (x puits pour x ARN à doser en duplicat si possible + 1 puits « blanc » 200 µL : H₂O)
- Ajouter 4µL d'ARN/puits (soit dilution au 1/50)
- Lire la DO à 230 nm, 260 nm et 280 nm sur le spectrophotomètre (se référer à la procédure correspondante)
- Choisir les longueurs d'onde de lecture (cocher «multiple measurements» et ajouter 230, 260 et 280 nm)
- Cocher «Pathlength correction» pour la lecture en microplaque

- Sélectionner le facteur de correction : H₂O
- Noter les valeurs ou imprimer
- Calculer les ratios 260nm/230nm et 260nm/280nm → ratios le plus proche de 2 possibles
- Calculer les concentrations = DO*40*facteur de correction*facteur de dilution.

Isoler l'ARN

- Préparer « X ml » d'une solution de RLT Plus + βME (10μL de βME pour 1 ml de RLT Plus)
- Ajouter 350μL de RLT plus + βME sur les cellules → *lyse des cellules*
- Homogénéiser le lysat à la pipette et vortexer
- Déposer le lysat sur une colonne QiaGene → *homogénéisation du lysat*
- Centrifuger 2 min. à 10000g à TA
- Récupérer le lysat homogénéisé
- Déposer le lysat homogénéisé sur une colonne gDNA Eliminator spin (fermer à l'aide des bouchons fournis) → *élimination de l'ADN génomique*
- Centrifuger 30 sec à 10000g à TA
- Récupérer l'éluât
- Ajouter 1 volume d'ETOH 70% (V/V) sur l'éluât → *ARN « charge - » pour liaison sur la membrane de silice de la colonne*
- Homogénéiser à la pipette
- Déposer le volume (en une ou deux fois suivant la quantité) sur une colonne RNeasy mini spin → *fixation de l'ARN sur la colonne*
- Centrifuger 15 sec à 10000g à TA
- Eliminer « l'éluât sale »
- Ajouter 700μL de RW1 sur la colonne → *lavages : élimination des contaminants*
- Centrifuger 15 sec à 10000g à TA
- Eliminer « l'éluât sale »
- Ajouter 500μL de RPE sur la colonne → *lavages...*
- Centrifuger 15 sec à 10000g à TA
- Eliminer « l'éluât sale »
- Ajouter 500μL de RPE sur la colonne → *lavages...*
- Centrifuger 2 min. à 10000g à TA
- Eliminer « l'éluât sale »
- Changer le tube collecteur 2ml et centrifuger 1 min. à 10000g → *élimination de l'ETOH résiduel*
- Placer la colonne sur un tube collecteur propre de 1.5ml
- Ajouter 50μL de H₂O RNase free au centre de la colonne → *élution de l'ARN de la colonne*
- Incuber 1min à TA
- Centrifuger 1 min à 10000g à TA

- Récupérer l'éluât (ARN) et le redéposer sur la colonne
- Centrifuger 2 min à 10000g à TA
- Récupérer l'éluât (ARN)

Test de nouveau la quantité d'ARN

- Placer 200µL/puits d'H₂O Rnase free dans la plaque 96 puits (x puits pour x ARN à doser en duplicat si possible + 1 puits « blanc » : H₂O)
- Ajouter 4µL d'ARN/puits (soit dilution au 1/50)
- Lire la DO à 230 nm, 260 nm et 280 nm sur le spectrophotomètre (se référer à la procédure correspondante), pour indication :
 - Etablir le schéma de la plaque à lire (ne pas oublier de spécifier le « blanc » pour la correction sur l'eau)
 - Choisir les longueurs d'onde de lecture (cocher « multiple measurements » et ajouter 230, 260 et 280 nm)
 - Cocher « pathlength correction » pour la lecture en microplaque
 - Sélectionner le facteur de correction : H₂O
 - Noter les valeurs ou imprimer
 - Calculer les ratios 260nm/230nm et 260nm/280nm → ratios le plus proche de 2 possibles
- Calculer les concentrations = (DO mesuré*40*facteur de dilution)/1000
- Congeler et conserver le reste des ARN à -80°C. (Fin jours 2)

Annexe 8 : Quantification d'ARN par ribogreen

PREPARATION DES SOLUTIONS au moment du dosage:

- **Tampon TE 1X** : diluer la solution mère (20X) au 1/20 dans H₂O RNase-free. Le volume restant de tampon TE 20X non utilisé doit être recongelé à -20°C.
- **ARN ribosomal étalon 1 µg/mL** : diluer la solution mère d'ARNrib (100µg/mL) au 1/100 dans le tampon TE 1X soit 5 µl ARNrib mère + 495 µl tp TE 1X
- **Ribogreen dilué** : **A PREPARER AU DERNIER MOMENT i.e. après avoir déposé étalon et extraits dans les puits et préparer l'appareil de lecture** – Diluer la solution mère de ribogreen au 1/200 dans le tampon TE 1X – Conserver à l'abri de la lumière

TECHNIQUE :

Diluer les extraits d'ARN à doser **dans le tampon TE 1X** de façon à être dans la gamme d'étalonnage sous 25 µl minimum à 100 µl maximum d'échantillon
 Le dosage est réalisé directement en plaque noire de 96 puits.
 Préparer **la gamme étalon et les extraits à doser** comme suit :

Concentration	Quantité/puits	Tamp TE 1X	ARNrib 1µg/mL	Extrait ARN à doser
µg/mL ds le puits	ng ds le puits	µl	µl	µl
Blanc	0	100	0	-
0.050	10	90	10	-
0.125	25	75	25	-
0.250	50	50	50	-
0.375	75	25	75	-
0.500	100	0	100	-
Extrait à doser	inconnu	100-v	-	v (25 à 100 µL)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Gamme					Gamme (duplicate)						
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Préparer la plaque sur le logiciel du CFX96 (cf. explications page suivante)

Répartir 100 µl de Ribogreen dilué dans tous les puits

Laisser incuber au maximum 3 min à l'abri de la lumière (emballer la plaque dans une feuille d'aluminium)

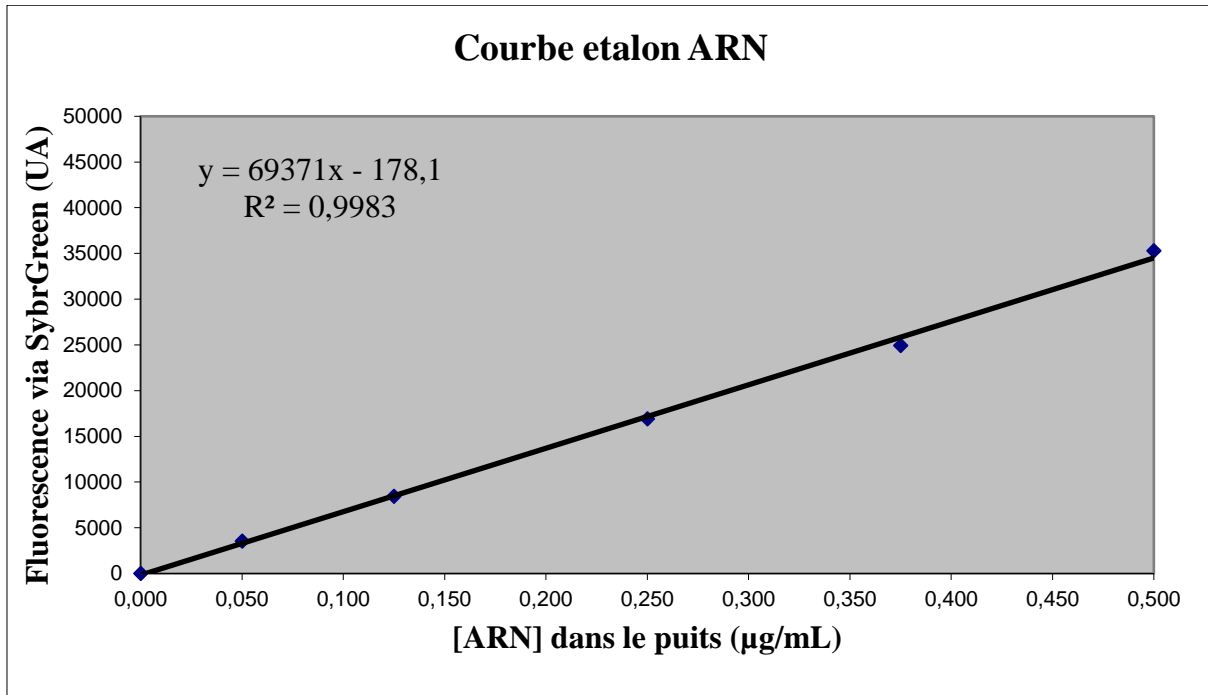
Recouvrir la plaque du film autocollant

Lire au spectrofluorimètre (thermocycler CFX96) :

- Allumer le PC et le CFX96
- Lancer le logiciel **CFX Manager Software**
- Pas de mot de passe, laisser « User : marité » et faire OK
- Cliquer sur « User Defined ».
- Onglet Protocol : « Select existing », aller dans son dossier et sélectionner le protocole Ribogreen et OK.
Si nouvel utilisateur : se créer un dossier à son nom dans Users (cf. raccourci Users sur le bureau), créer trois dossiers : Protocoles types, Plaques, Data files. Copier-coller les protocoles d'un autre utilisateur dans son propre dossier.
- Onglet plate : « Create New », sélectionner les puits voulus et les qualifier en « Unknown », en dessous, bien cocher la case SYBR, puis dans Target Name, mettre les noms des échantillons (gamme, etc...).
- Pour imprimer le plan de plaque, allumer l'imprimante et aller dans Files, Print.
- Dernier onglet Run : installer la plaque dans l'appareil en cliquant sur le bouton pour l'ouvrir, installer la plaque, attendre qu'il ait fini de faire du bruit puis cliquer sur fermer.

- Cliquer sur « Start Run ».
- Quand la mesure est terminée, dans la fenêtre qui vient de s'ouvrir : aller dans l'onglet « End Points », sélectionner les valeurs, clique-droit, exporter en Excel et enregistrer sur sa clé USB.
- Fermer le logiciel, le PC, l'appareil et l'imprimante.

RESULTAT DE LA COURBE ETALONNAGE :



Annexe 9 : Reverse transcription de l'ARN

Décongeler au préalable les tubes de réaction mix et nuclease-free water.

Distribuer, dans chaque tube, les volumes de nuclease-free water puis d'ExARN pour 1 ou 2 µg d'ARN (cf tableau) - Vortexer

Incuber 5 min à 65°C pour favoriser le déroulement des structures double brin.

Placer les tubes pendant 5 min dans la glace.

Pendant ce temps d'incubation, préparer le volume de Mix RT nécessaire à raison de : 4 µl 5x iScript reaction mix / tube

1 µl iScript reverse transcriptase / tube

Pour le volume de Mix à prévoir, compter le nombre d'échantillon + Trt + pool étalon + >2 tubes supplémentaires au minimum – Mix à distribuer sous 5 ou 10 µl (cf tableau)

	Conditions RT pour 1 µg ARN			Conditions RT pour 2 µg ARN		
Tube	Trt	Pool étalon	Echantillon	Trt	Pool étalon	Echantillon
<u>Nuclease-free water</u>	15 µl	(15-v) µl	(15-v) µl	30 µl	(30-2v) µl	(30-2v) µl
Ex ARN	0	v (µl)	v (µl)	0	2v (µl)	2v (µl)
Condition incubation	5 min à 65°C (prog pré-RT) 5 min à 4°C			5 min à 65°C (prog pré-RT) 5 min à 4°C		
Mix RT	5 µl	5 µl	5 µl	10 µl	10 µl	10 µl
Volume total RT	20 µl			40 µl		
Condition incubation	Prog RT Biorad			Prog RT Biorad		
Nuclease-free water	80 µl			160 µl		
[cDNA] ng/ µl	10 ng/µl			10 ng/µl		

Programme RT Biorad :

5 min à 25°C

30 min à 42°C

5 min à 85°C

Forever à 4°C

Conservation des aliquots cDNA : à -20°C

LISTES DES COMMUNICATION ET PRIX

Communication oral :

2016 :

- Effet d'une augmentation de la gravité par centrifugation (2g) sur l'appareil musculo-squelettique dans un modèle d'arthrose chez la souris.
DECHAUMET B, Cleret D, Laroche N, Vanden-Bossche A, Lafage-Proust MH, Vico L
Journées Françaises de Biologie des Tissus Minéralisés (JFBTM), 1 au 3 juin 2016 (NANCY)

Communications affichées :

2017 :

- Effects of 2g hypergravity on osteoarthritis-induced bone and muscle changes
DECHAUMET B, Cleret D, Laroche N, Vanden-Bossche A, Lafage-Proust MH, Vico L
American Society for Bone and Mineral Research (ASBMR), 7 au 11 Septembre 2017 (DENVER - COLORADO)
- Impact of obesity on the musculoskeletal system in osteoarthritis mouse model
DECHAUMET B, Cleret D, Laroche N, Vanden-Bossche A, Lafage-Proust MH, Vico L
Journées Françaises de Biologie des Tissus Minéralisés (JFBTM), 18 au 20 Mai 2017 (LYON)
- Are whole body vibrations able to counteract. The evolution of osteoarthritis in obese mice?
DECHAUMET B, Cleret D, Laroche N, Vanden-Bossche A, Lafage-Proust MH, Vico L
Journées Françaises de Biologie des Tissus Minéralisés (JFBTM), 18 au 20 Mai 2017 (LYON)
- Effet des vibrations corps entier comme contre-mesure à l'évolution de l'arthrose chez des souris avec différents grades d'obésités
DECHAUMET B, Cleret D, Laroche N, Vanden-Bossche A, Lafage-Proust M1, Vico L
Journée de l'école doctorale et de la recherche, 14 Juin 2017 (SAINT ETIENNE)

2016 :

- Effet d'une augmentation de la gravité par centrifugation (2g) sur l'appareil musculo-squelettique dans un modèle d'arthrose chez la souris.
DECHAUMET B, Cleret D, Laroche N, Vanden-Bossche A, Lafage-Proust MH, Vico L
Biotuesdays Lyon, 3 Mai 2016 (LYON)
- Effet d'une augmentation de la gravité par centrifugation (2g) sur l'appareil musculo-squelettique dans un modèle d'arthrose chez la souris.
DECHAUMET B, Cleret D, Laroche N, Vanden-Bossche A, Lafage-Proust MH, Vico L
Académie de médecine, 10 Mai 2016 (SAINT-ETIENNE)
- Effet d'une augmentation de la gravité par centrifugation (2g) sur l'appareil musculo-squelettique dans un modèle d'arthrose chez la souris.
DECHAUMET B, Cleret D, Laroche N, Vanden-Bossche A, Lafage-Proust MH, Vico L
Journée de l'école doctorale et de la recherche- 16 Juin 2016 (SAINT-ETIENNE)

Prix :

2015 :

Prix d'excellence de la Fondation UJM catégorie Master/Ingénieurs pour l'étude de l'impact de la surcharge pondérale et des troubles métaboliques sur l'appareil musculo-squelettique et efficacité des vibrations corps entiers comme contremesure de la fragilité ostéo-articulaire et musculaire.

CURRICULUM VITAE

DECHAUMET Benoît

Né le 04-10-1990

Marié

423 rue Fontanesium

42140 FONTANES

Tel : 04 77 92 45 40

ou 06 33 46 67 49

Mail :
bdechaumet@gmail.com



Objectif :

Obtenir un poste

Compétences additionnelles :

- Calme
- Organiser
- Curieux
- Intéresser
- Dynamique

Diplômes Obtenus

2014 – 2017 : Préparation du diplôme de docteur en sciences biologiques

2015 : Lauréat du Prix d'excellence Master Ingénieur de la Fondation UJM
Obtention de l'expérimentation animale de Niveau I

2014 : Master Sciences Biologiques et Technologiques pour la Santé, Faculté des Sciences et Techniques et Faculté de Médecine de Saint-Etienne. Mention : Très Bien

2012 : Licence Biologie Cellulaire et Physiologie, Faculté des Sciences et Techniques de Saint-Etienne. Mention : Assez Bien

2010 : 1^{er} année de Médecine, Faculté Jacques Lisfranc de Saint-Etienne. (Reçu-coller)

2009 : Baccalauréat Scientifiques, lycée Simone Weil de Saint-Priest en Jarez

Expériences professionnelles

- Liées aux études universitaires

Octobre 2014 à Septembre 2017 : (en cours) Thèse de Sciences en biologie au Laboratoire de Biologie intégrative du Tissu Osseux sur l'impact de la surcharge pondérale et des troubles métaboliques sur l'appareil musculo-squelettique

Compétences acquises : Travail sur modèle animal (souris), histologie, immunologie, biologie moléculaires, extraction d'ARN et PCR, analyse d'image (Image J), encadrement de stagiaire (BTS, Master)

Septembre 2015 à aujourd'hui : Monitorat pour les 1^{ères} années de PACES, Master 1 et 2 Sciences et STAPS

Compétences acquises : Enseignement en biologie cellulaires et moléculaires, bio-statistique, optique, électromagnétisme, biophysique et biochimie

Janvier à Juin 2014 : Stage au laboratoire du Groupe sur l'Immunité des Muqueuses et Agents Pathogènes sur l'évaluation et la caractérisation du rôle fonctionnel des Anticorps présent dans le sperme de patient infectés par HIV ou exposés non infectés

Compétences acquises : Techniques de Western Blot, purification d'anticorps, test de fonctionnalité des anticorps, test EIA, mapping, cultures cellulaires sur filtre et transmigration

Avril à Juin 2013 : Stage au Laboratoire Interdisciplinaire d'études des Nanoparticules Aérosolisées, sur l'évaluation de la nucléoline en tant que marqueur tumoral dans un modèle in vitro et corrélation avec le phénotype d'agressivité tumoral : l'hypoxie

Compétences acquises : cultures cellulaires, dosage protéique ELISA, Immunohistochimie Microscopie de fluorescence, mise en place de protocole, cytométrie de flux

Autres expériences professionnelles : Été 2009 à 2014 : Préparateur de commandes, Papèterie Pichon

Compétences théoriques et pratiques diverses

- Immunologie, histologie, biologie cellulaire et moléculaire, biochimie, biologie intégrative, optique et biostatistique;
- Techniques d'analyses et de détection cellulaires (PCR, chromatographie gazeuse et liquide, électrophorèse)
- Travail en équipe, organisation de projet
- Connaissance des normes et des équipements de sécurité en laboratoire

Divers et loisirs

- Anglais opérationnelle et technique (niveau B2)
- Utilisation Word, open office, Openstat, Graph Pad
- Permis B + Véhicule personnel
- Journée d'appel à la défense accomplie
- Bénévole à la Bibliothèque municipale de Fontanes
- Aime la lecture, l'écriture, apprendre et comprendre
- Pratique du ski de descente et tir à l'arc

RESUME

L'obésité et le syndrome métabolique sont tous deux associés à un risque de fragilité musculo-squelettique, en particulier d'arthrose. Notre but est d'explorer leurs contributions relatives en comparant un modèle associant obésité et conditions métaboliques avec un modèle mimant le surpoids de l'obésité par exposition à une hypergravité. L'obésité MM (mécanique et métabolique) est obtenue par un régime alimentaire qui débute chez des C57BL6/J mâles de 5 semaines. L'obésité M (mécanique) est mimée par une exposition continue à une hypergravité à 2g qui débute à l'âge de 16 semaines. L'arthrose (OA) est induite à l'âge de 16 semaines par déstabilisation du ménisque médial de la patte postérieure droite. Les souris sont mises à mort à 24 semaines.

Nous avons tout d'abord exploré les effets des obésités MM et M sur le système musculo-squelettique de souris non arthrosiques. Les obèses MM ont un os (tibia proximal droit) trabéculaire préservé, un os cortical plus fin et moins poreux et des muscles (tibialis, gastrocnémien, soléaire) fragilisés (diminution de la masse, de la force globale, augmentation du nombre de fibres avec gouttelettes lipidiques). A l'opposé chez les obèses M, l'os est préservé et les muscles sont renforcés (gain de masse, fibres du gastrocnémien plus orientées vers un profil oxydatif lent, stimulation des voies de signalisation). Ce sont donc les troubles métaboliques qui sont responsables de la fragilisation de l'os cortical et du muscle.

Dans une deuxième partie, les conséquences de l'OA sont évaluées chez des souris non obèses, obèses MM ou M. L'OA chez les non obèses fragilise l'os trabéculaire de la métaphyse tibiale (et augmente la résorption ostéoclastique) mais n'a aucun effet significatif ni sur l'os cortical, ni sur les muscles adjacents à l'articulation arthrosique. L'OA chez les obèses MM accentue la diminution de l'épaisseur corticale tout en augmentant sa porosité et n'induit pas de détériorations supérieures à celles de l'obésité MM seule pour les autres paramètres. L'OA chez les souris obèses M fragilise encore plus l'os cortical et le muscle que chez les souris MM. Cependant si on ne considère que les souris OA, la composante MM est toujours plus délétère que la composante M.

Dans une dernière partie nous avons testé les vibrations corps entiers (90Hz, 0.5g, 15 min/jour, 5 jours/7) pendant les 4 dernières semaines (entre l'âge de 20 et 24 semaines) comme traitement potentiel des détériorations musculo-squelettiques de l'obésité MM couplée ou non à l'OA. Les vibrations n'impactent pas la sévérité de l'obésité ou de l'arthrose. Un effet musculaire est observé au niveau moléculaire : diminution de l'expression de la myostatine et de son récepteur Act R11b, de la visfatine, de FNDC5, PPAR- γ et CEBP- α , ces diminutions étant plus importantes chez les OA. Toutefois aucun changement de masse musculaire, aire et typage des myofibres n'est observé. Le tissu osseux n'est pas influencé. Ce traitement est donc neutre pour l'os et semble amorcer un effet positif sur le muscle. Les modalités du régime vibratoire, si elles ne sont pas délétères, doivent être optimisées pour obtenir un effet macroscopique.

En conclusion, chez les souris non OA, seuls les troubles métaboliques diminuent l'épaisseur corticale. Par contre chez les OA, l'impact mécanique s'ajoute à l'impact métabolique pour augmenter la fragilité de l'os cortical. L'obésité MM est délétère pour les muscles avec ou sans OA. Les troubles métaboliques s'accompagnent d'un défaut de vascularisation et d'une augmentation de l'adiposité dans l'os et le muscle. L'hypergravité à 2g (obésité M) corrige l'invasion graisseuse musculaire chez les non OA et OA, et médullaire chez les non OA seulement. L'hypergravité à 2g renforce le muscle même chez les arthrosiques.