



HAL
open science

Microarchitecture osseuse et adiposité médullaire de la mandibule : étude expérimentale chez la ratte adulte ovariectomisée

Xavier Coutel

► To cite this version:

Xavier Coutel. Microarchitecture osseuse et adiposité médullaire de la mandibule : étude expérimentale chez la ratte adulte ovariectomisée. Médecine humaine et pathologie. Université de Lille, 2018. Français. NNT : 2018LILUS021 . tel-02617059

HAL Id: tel-02617059

<https://theses.hal.science/tel-02617059>

Submitted on 25 May 2020

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

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

UNIVERSITE DE LILLE
ECOLE DOCTORALE BIOLOGIE-SANTE DE LILLE

ANNEE 2018

N° :

THÈSE
Pour l'obtention du
DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LILLE
Spécialité : Biologie Orale

Présentée et soutenue publiquement par

Xavier COUTEL

le 19 novembre 2018

**MICROARCHITECTURE OSSEUSE ET ADIPOSITE MEDULLAIRE DE LA
MANDIBULE :**
Etude expérimentale chez la ratte adulte ovariectomisée

Membres du jury

Présidente : Professeur Ariane BERDAL
Rapporteur(e)s : Professeur Marie-Hélène LAFAGE-PROUST
Professeur Philippe LESCLOUS
Examineur : Professeur Julien PACCOU
Directeur de thèse : Professeur Guillaume PENEL
Co-directrice thèse : Docteur Cécile OLEJNIK

UNIVERSITE DE LILLE
ECOLE DOCTORALE BIOLOGIE-SANTE DE LILLE

ANNEE 2018

N° :

THÈSE
Pour l'obtention du
DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LILLE
Spécialité : Biologie Orale

Présentée et soutenue publiquement par

Xavier COUTEL

le 19 novembre 2018

**MICROARCHITECTURE OSSEUSE ET ADIPOSITE MEDULLAIRE DE LA
MANDIBULE :**
Etude expérimentale chez la ratte adulte ovariectomisée

Membres du jury

Présidente : Professeur Ariane BERDAL
Rapporteur(e)s : Professeur Marie-Hélène LAFAGE-PROUST
Professeur Philippe LESCLOUS
Examineur : Professeur Julien PACCOU
Directeur de thèse : Professeur Guillaume PENEL
Co-directrice thèse : Docteur Cécile OLEJNIK

REMERCIEMENTS

Aux membres du jury

Que Messieurs et Mesdames les membres du jury trouvent ici l'expression de mon profond respect et de mes sincères remerciements pour m'avoir permis de soutenir ma thèse d'université, fruit de quatre années de travail.

A Monsieur le Professeur Guillaume PENEL, directeur de thèse, directeur du laboratoire PMOI – EA 4490, que je tiens à remercier vivement pour son accueil bienveillant au sein du PMOI en 2011 et pour m'avoir orienté tout au long de mon parcours de recherche en partageant connaissances et conseils scientifiques avisés. Merci également pour les diverses opportunités et rencontres que vous avez rendues possibles au cours de ma formation qui ont indéniablement contribué à enrichir mes compétences et stimulé mon goût pour la recherche.

A Madame le Docteur Cécile OLEJNIK, co-directrice de thèse, pour ton aide précieuse et constante tout au long de ce travail de thèse comme de master. Un grand merci également pour m'avoir transmis ta passion pour la recherche, fait partagé ta curiosité pour faire mûrir ce projet, et d'avoir été présente dans les moments difficiles et de doutes au labo comme en clinique ! C'est une chance que d'avoir croisé ton chemin et j'espère de tout cœur pouvoir continuer à travailler à tes côtés à l'avenir.

A Madame le Professeur Ariane BERDAL, directrice de recherche INSERM de l'UMR_S1138, Centre de Recherche des Cordeliers, de l'Université Paris Diderot, que je remercie de l'honneur et du plaisir de vous compter parmi les membres de ce jury de thèse. Votre enseignement au cours de mon master aura marqué mon parcours de recherche et vos conseils au cours des réunions de comité de suivi de thèse ont toujours été constructifs et d'une précieuse aide, je vous en remercie infiniment.

A Madame le Professeur Marie-Hélène LAFAGE-PROUST, du laboratoire SAINBIOSE - INSERM U1059 de l'Université de Saint-Etienne, pour vos encouragements et la pertinence de vos remarques et questions en congrès comme en réunion de comité de suivi de thèse. Je tiens à vous remercier pour l'intérêt, l'engagement et l'attention que vous manifestez aux « plus jeunes » notamment via la SFBTM. Merci également d'avoir accepté de juger ce travail de thèse.

A Monsieur le Professeur Philippe LESCLOUS, du laboratoire INSERM U 791 de l'Université de Nantes, à qui j'exprime toute ma gratitude pour m'avoir fait l'honneur de participer à ce jury de thèse en qualité de rapporteur. Pour avoir eu le plaisir de vous rencontrer occasionnellement durant ma formation, j'ai pu apprécier votre chaleureuse simplicité et vos compétences riches d'enseignement.

A Monsieur le Professeur Julien PACCOU, du laboratoire PMOI, pour l'intérêt porté à mon projet de thèse depuis ton retour d'outre-manche avec le regard d'un clinicien toujours intéressant. Merci également pour tes encouragements et ta bonne humeur communicative. Merci enfin d'avoir accepté d'évaluer ce travail.

Aux personnes qui ont participé à la réalisation de ce travail

Ce travail a été réalisé grâce à tous ceux qui m'ont formé, conseillé, aidé et à qui je tiens à exprimer ici ma gratitude.

Au Docteur Greet KERCKHOFS, pour avoir eu la chance de collaborer avec toi et bénéficier ainsi des précieux conseils d'une spécialiste du microCT ; merci d'avoir contribué à faire mûrir ce projet, d'avoir partagé ton savoir et ton expertise ; merci aussi pour ta disponibilité, ta spontanéité et ta gentillesse lors de ta venue au laboratoire. Je garderai aussi en mémoire le match des diables rouges autour d'une bonne bière !

A Thomas, Arnold, Martin, Michel, Christian, Caroline, Audrey, Franck... la fine équipe du DHURE, merci pour votre accueil, votre disponibilité (week-end et jours fériés compris !) et votre aide dans les expérimentations animales.

Aux membres du laboratoire d'anatomie, en particulier Maurice et Franck, merci pour votre accueil toujours souriant...avec café et... blagues... !

A Sylvie REGNIER (et Déborah), du laboratoire des Processus et Bilans des Domaines Sédimentaires de l'UMR 8110 de l'USTL, merci pour la réalisation des lames d'observations et pour votre gentillesse à toutes les deux lors de mes visites au SN 5.

A Philippe RE COURT, du laboratoire des Processus et Bilans des Domaines Sédimentaires de l'UMR 8110 de l'USTL, merci pour ton agréable et joviale compagnie et le partage de ton savoir lors des séances de MEB.

A l'équipe de la Maison Régionale de la Recherche Clinique du Centre Universitaire de Lille, pour leur aide précieuse dans les analyses statistiques et en particulier à Hélène BEHAL pour sa patience et ses encouragements constants.

A la Société Française de Rhumatologie (SFR), pour avoir retenu mon projet de thèse et avoir contribué ainsi à son financement.

Aux membres du laboratoire

A Monsieur le Professeur Pierre HARDOUIN, ex-directeur du laboratoire, pour m'avoir accueilli si chaleureusement au sein de l'équipe et avoir égayé à de nombreuses reprises le fameux « chemin parcouru », toujours avec beaucoup d'humour. Professeur passionné et passionnant, merci aussi pour l'intérêt que vous avez porté à mes sujets de recherche, et pour les remarques pertinentes prononcées lors de nos exposés au laboratoire. C'est avec un mélange d'admiration et de sympathie que je tiens à vous remercier.

A Monsieur le Professeur Bernard CORTET, merci pour vos conseils experts dans le domaine osseux avec votre œil de clinicien toujours pertinent.

A Guillaume FALGAYRAC, merci pour ta gentillesse, ta patience et ton aide indispensable toujours avec le sourire et l'accent chantant du sud-ouest !

A Pierre, Jérôme et plus récemment encore Nicolas, dont l'aide précieuse a été indispensable à la réalisation de ce projet.

A Thomas COLARD, merci de m'avoir transmis le virus et la passion communicative pour la recherche (la vraie !) ; merci aussi d'avoir été toujours aussi bienveillant et de bons conseils. J'espère que nous aurons l'occasion de travailler sur des projets communs à l'avenir.

A Alexandrine DURING, merci entre autre pour tous ces petits moments d'échanges précieux depuis mon arrivée au laboratoire.

A tous les boulonnais, merci pour nos échanges riches et stimulants. Merci Séverine pour le partage de tes connaissances et techniques de laboratoire.

Aux compagnons de paillasse...et de détente, pour votre joyeuse compagnie durant ces années : Tristan (alias barbu n°1) toujours le mot pour rire !, Jean-François, Daniella, Nicolas, Gael, Yann, Marie-Anne, Cindy et l'équipe des entomologistes. Je vous souhaite toute la réussite que vous méritez dans vos projets et plein de belles surprises à l'avenir.

A Anne et Camille, les « mamans » du labo, toujours aux petits soins ! Merci !

A Yves BAILLEZ et Marc DANGLETERRE, merci pour les encouragements, le soutien et pour avoir su transmettre votre passion et votre curiosité pour la recherche et l'enseignement à plus d'un(e) étudiant(e). Votre rencontre aura indéniablement suscité une envie personnelle à poursuivre dans cette voie de l'enseignement et de la recherche.

A titre personnel, mes remerciements vont :

A mes parents. Merci de m'avoir toujours soutenu et accompagné avec cette « intelligence du cœur » quelque soit le projet. Je n'en serais pas là sans vous.

A mes deux frères, Jean et Vincent, pour votre présence dans tous les moments importants de la vie. Je souhaite de tout cœur que vous soyez heureux et épanouis dans vos projets de vie !

A Léa, mon épouse, merci du fond du cœur pour ton soutien indéfectible. Merci de trouver toujours les mots justes qui apportent le réconfort et donne l'énergie de franchir les obstacles et gravir les montagnes...

Aux FLANXEs, pour vos ondes positives et envolées lyriques toujours réconfortantes.

A Mathieu, Julien, Florine et Arthur, témoins pour toujours !

A mes amis de fac, Julien, Gauthier, Antoine, Kévin, Pierre, Aurélie(s), Marion, Emilie, Mylène... Merci pour ces belles années passées ensemble et au plaisir de recroiser votre route où que vous ayez atterri !

Et à tous ceux qui ne sont pas mentionnés nominativement ici mais à qui j'ai une pensée toute particulière, veuillez trouver ici, chacun(e) d'entre vous, un tout petit témoignage de l'affection que je vous porte.

RESUME

Microarchitecture osseuse et adiposité médullaire de la mandibule:

Etude expérimentale chez la ratte adulte ovariectomisée

L'ostéoporose est une maladie fréquente et généralisée du squelette qui se caractérise par une perte de masse osseuse et des altérations de la structure des os. Ces variations des propriétés osseuses, observées à diverses échelles et associées à une augmentation du contenu adipeux de la moelle, témoignent d'une plus grande fragilité du squelette. Ces modifications sont cependant différentes en fonction du site. Cette variation du contenu adipeux médullaire, rapportée notamment dans les os longs du squelette appendiculaire, semble jouer un rôle crucial dans la survenue de l'ostéoporose. Néanmoins, ces altérations ostéo-médullaires, aussi bien quantitatives que qualitatives, sont controversées et peu documentées au niveau des maxillaires, la mandibule en particulier. Le but de notre étude est d'évaluer, au cours du vieillissement et dans un modèle d'ostéoporose (ratte adulte ovariectomisée), les relations entre les variations du contenu adipeux médullaire et la microarchitecture osseuse en site mandibulaire en comparaison avec un site de référence, le tibia. La microarchitecture osseuse, la quantité et la répartition du contenu adipeux médullaire après marquage au tétr oxyde d'osmium ont été analysées par microtomographie à rayons X dans la mandibule dentée (os alvéolaire) et non dentée (condyle). Au cours du vieillissement, aucune altération des paramètres osseux et médullaires n'a été mise en évidence. En revanche, le déficit hormonal en oestrogènes induit par ovariectomie conduit à une perte osseuse plus marquée (+35%) dans le tibia que dans la mandibule, associée à des modifications microarchitecturales et adipeuses médullaires site-spécifiques. En effet, en comparaison avec le tibia, un faible contenu adipeux (<10% de moelle) est retrouvé dans le secteur denté (alvéolaire) ainsi que non denté (condyle). A la différence du tibia, au sein duquel un effet de « clustering » des adipocytes est observé à la surface osseuse trabéculaire, le contenu adipeux mandibulaire est réparti de manière homogène dans les espaces médullaires avec très peu de contact avec la surface osseuse trabéculaire. En conclusion, nos résultats indiquent une perte osseuse modérée dans la mandibule par rapport au tibia associée à une augmentation du contenu adipeux médullaire tardive dont la répartition au sein des espaces médullaires n'est pas modifiée à la différence du tibia. Nous émettons l'hypothèse qu'une activité de remodelage et des sollicitations biomécaniques différentes puissent expliquer les spécificités physiopathologiques observées en site mandibulaire. D'autres études seront nécessaires pour préciser l'impact de telles modifications sur la qualité osseuse à l'échelle moléculaire et élémentaire, ainsi que pour préciser les mécanismes de dialogues entre les ostéoblastes et les adipocytes.

Mots clés : Mandibule ; Microarchitecture osseuse ; Adiposité médullaire ; Marquage au tétr oxyde d'osmium ; Microtomographie à RX.

ABSTRACT

Bone microstructure and bone marrow adiposity in the mandible: Experimental study in the adult ovariectomized rat model

Osteoporosis is a common disease of the skeleton characterized by a loss of bone mass and changes in bone structure. These variations in bone properties, observed at various scales and associated with an increase in the bone marrow adipose tissue (BMAT) content, indicate a greater fragility of the skeleton in a site-specific manner. This variation in the BMAT content, reported in some skeletal sites, seems to play a crucial role in the occurrence of osteoporosis. Nevertheless, these bone and marrow alterations, both quantitative and qualitative, are controversial and still poorly documented in the jaw bones, the mandible in particular.

The aim of our study was to investigate, during aging and in a rodent model of osteoporosis (adult ovariectomized rat), the relationships between the changes in the bone microstructure, the marrow fat content and its distribution in the mandibular site in comparison with a reference site, the tibia. The bone microstructure, the bone marrow fat content and its distribution after osmium tetroxide staining were analyzed by a specific X-ray microfocus tomography approach in the mandible in the teeth-bearing area (alveolar bone) and in the condyle. During aging, neither bone nor bone marrow alterations have been observed. In contrast, estrogen deficiency did lead to more important bone loss (+35%) in the tibia than in the mandible associated with site-specific microstructural and BMAT modifications. Indeed, in comparison with the tibia, a low BMAT content (<10% of marrow volume) was found in the alveolar bone as well as in the condyle. Compared to tibia which reveals a clustering of the marrow adipocytes at the trabecular bone surface, the mandibular BMAT content was homogeneously distributed and located further away with almost no contact with the trabecular bone surface. In conclusion, our results indicate a moderate bone loss in the mandible compared to the tibia associated with an increase in the BMAT content whose distribution within the marrow spaces is not modified in contrast to tibia. We hypothesize that a differential bone turn-over rate, biomechanical stress may explain in part the mandibular physiopathological specificities reported. Further studies will be needed to precise the impact of such alterations on bone quality at the molecular and elemental level, as well as to depict the mechanisms of dialog between osteoblasts and adipocytes.

Keywords: Jaw bones; Bone microstructure; Bone marrow adipose tissue; Osmium tetroxide staining; X-ray microtomography.

AVANT-PROPOS

Ce travail de thèse a été réalisé au sein du laboratoire de Physiopathologie des Maladies Osseuses Inflammatoires, PMOI – EA 4490 de Lille, sous la direction du Professeur Guillaume PENEL et la co-direction du Docteur Cécile OLEJNIK.

Ce manuscrit est composé d'une introduction générale qui présente les principales caractéristiques de l'ostéoporose au sein du squelette, suivie d'un état de l'art ciblant les spécificités du site mandibulaire et les rôles de l'adiposité médullaire comme acteur émergent dans la régulation du métabolisme osseux. Dans ce contexte, ce travail a vocation à décrire les altérations ostéo-médullaires au sein de la mandibule dentée (os alvéolaire) et non dentée (condyle) observées au cours du vieillissement et de l'ostéoporose post-ménopausique dans le modèle de la ratte adulte ovariectomisée.

Pour cela, un protocole original d'analyse d'images par microCT permettant la visualisation et la quantification de paramètres de microarchitecture osseuse d'une part, et d'adiposité médullaire et sa répartition au sein de la moelle après marquage à l'osmium (agent de contraste) d'autre part, a été développé et donné lieu à une publication. La comparaison de la microarchitecture osseuse et du contenu adipeux médullaire et sa répartition au sein des différentes localisations squelettiques d'intérêt (mandibule, tibia) à baseline (6 mois d'âge) est présentée. Les variations de la microarchitecture osseuse, du contenu et de la distribution adipeuse médullaire observés au cours du vieillissement et de l'ostéoporose après ovariectomie font l'objet d'une deuxième partie (article en préparation).

Enfin, une analyse critique des principaux résultats obtenus et des limites du modèle est discutée, mettant en avant l'intérêt de ce travail qui ouvre plusieurs perspectives et questions scientifiques intéressantes sur le rôle local des adipocytes médullaires et de leurs médiateurs dans le remodelage osseux et la minéralisation de la mandibule.

TABLE DES MATIERES

RESUME	I
ABSTRACT	II
AVANT-PROPOS.....	III
TABLE DES ILLUSTRATIONS	3
LISTE DES ABREVIATIONS.....	4
INTRODUCTION GENERALE	6
CHAPITRE 1 : ETAT DE L'ART	8
I. LA MANDIBULE : UN OS SPECIFIQUE ?.....	8
1. <i>Relation ostéo-médullaire dans la mandibule</i>	11
II. L'ADIPOSITE MEDULLAIRE : NOUVEL ACTEUR DANS L'HOMEOSTASIE OSSEUSE ?	14
1. <i>Origine de l'adiposité médullaire (BMAT)</i>	14
2. <i>Adipogenèse et différenciation adipocytaire</i>	15
3. <i>Caractéristiques phénotypiques des adipocytes médullaires</i>	17
4. <i>Propriétés connues des adipocytes médullaires.....</i>	18
5. <i>Distribution squelettique de l'adiposité médullaire</i>	19
III. IMPLICATION DE L'ADIPOSITE MEDULLAIRE DANS LA PERTE OSSEUSE ?.....	21
1. <i>Mécanismes généraux de perte osseuse au cours du vieillissement et de l'ostéoporose ..</i>	21
2. <i>Place de l'adiposité médullaire dans la perte osseuse</i>	21
3. <i>Rôle de l'adipocyte médullaire dans la perte osseuse</i>	23
4. <i>Modèle de la ratte adulte ovariectomisée</i>	25
CHAPITRE 2 : OBJECTIFS.....	28
CHAPITRE 3 : MATERIELS ET METHODES	29
I. PROTOCOLE EXPERIMENTAL.....	29
II. PREPARATION DES ECHANTILLONS.....	31
III. ACQUISITION ET RECONSTRUCTION D'IMAGE PAR MICROCT : SCAN1.....	32
IV. PROTOCOLE DE MARQUAGE DE L'ADIPOSITE MEDULLAIRE AU TETROXYDE D'OSMIUM.....	33
V. ACQUISITION ET RECONSTRUCTION D'IMAGE PAR MICROCT : SCAN2.....	34
VI. ALIGNEMENT DES JEUX DE DONNEES D'IMAGE : SUPERPOSITION SCAN 1 ET SCAN 2.....	34
VII. DETERMINATION DES VOLUMES ET REGIONS D'INTERET (VOI-ROI)	35
VIII. PARAMETRES DE MICROARCHITECTURE OSSEUSE TRABECULAIRE	37
IX. CONTENU ET DISTRIBUTION DE L'ADIPOSITE MEDULLAIRE	39
X. TRAITEMENTS STATISTIQUES.....	40
XI. ANALYSE STATISTIQUE MULTIVARIEE.....	41
CHAPITRE 4 : RESULTATS	43
I. SUIVI DE LA PRISE ALIMENTAIRE.....	43
II. SUIVI DU POIDS CORPOREL DES ANIMAUX.....	44
III. SUIVI DE LA CROISSANCE OSSEUSE.....	47
IV. ÉTABLISSEMENT DE DONNEES DE REFERENCES A BASELINE	48
1. <i>Microarchitecture osseuse trabéculaire</i>	48
2. <i>Contenu adipeux médullaire</i>	50
3. <i>Relation spatiale entre surface osseuse trabéculaire et adiposité médullaire</i>	51
V. VIEILLISSEMENT.....	53
1. <i>Microarchitecture osseuse trabéculaire</i>	53
2. <i>Contenu adipeux médullaire</i>	53
VI. OVARIECTOMIE.....	55
1. <i>Rationnement alimentaire (pair-feeding).....</i>	55
2. <i>Microarchitecture osseuse trabéculaire</i>	55
3. <i>Contenu adipeux médullaire</i>	60

4.	<i>Etude des corrélations entre les paramètres de microarchitecture osseuse et d'adiposité médullaire</i>	61
5.	<i>Distribution de l'adiposité médullaire et relation avec la surface osseuse trabéculaire</i>	62
6.	<i>Apport de l'analyse statistique multivariée</i>	66
CHAPITRE 5 : DISCUSSION GENERALE		69
I.	SPECIFICITES DE SITE A BASELINE.....	69
II.	ALTERATIONS OSTEO-MEDULLAIRES DANS LE TIBIA	71
	1. <i>Au cours du vieillissement</i>	71
	2. <i>Au cours de l'ovariectomie</i>	73
III.	ALTERATIONS OSTEO-MEDULLAIRES DANS LA MANDIBULE	75
	1. <i>Au cours du vieillissement</i>	75
	2. <i>Au cours de l'ovariectomie</i>	75
IV.	INTERETS ET LIMITES DU MODELE UTILISE.....	77
CHAPITRE 6 : CONCLUSION-PERSPECTIVES		79
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES		82
ANNEXE(S)		101
PRODUCTION SCIENTIFIQUE		102
PUBLICATIONS		102
COMMUNICATIONS		102

TABLE DES ILLUSTRATIONS

FIGURE 1 : MORPHOLOGIE DU SQUELETTE MANDIBULAIRE.....	9
FIGURE 2 : PRINCIPAUX ROLES ATTRIBUES AUX ADIPOCYTES MEDULLAIRES	14
FIGURE 3 : PRINCIPAUX FACTEURS REGULANT LA BALANCE RESORPTION/FORMATION AU COURS DU REMODELAGE OSSEUX : PLACE DE L'ADIPOSITE MEDULLAIRE	24
FIGURE 4 : SCHEMA DU PROTOCOLE EXPERIMENTAL.....	29
FIGURE 5 : HEBERGEMENT CONVENTIONNEL DES ANIMAUX.	30
FIGURE 6 : TIBIA ET HEMI-MANDIBULE DROITS DE RATTE APRES FIXATION.....	31
FIGURE 7 : TIBIA ET HEMI-MANDIBULE MARQUEES AU TETROXYDE D'OSMIUM.	34
FIGURE 8 : SUPERPOSITION DES JEUX DE DONNEES AVANT/APRES MARQUAGE.....	35
FIGURE 9 : DETERMINATION DU VOLUME D'INTERET (VOI) DANS LES 3 SITES ANALYSES	36
FIGURE 10 : DETERMINATION DE LA ROI TRABECULAIRE DANS LES 3 SITES ANALYSES.....	37
FIGURE 11 : METHODE DE SEUILLAGE DANS LA MANDIBULE	38
FIGURE 12 : METHODE DE SEUILLAGE DANS LE TIBIA	38
FIGURE 13 : SUIVI DE LA PRISE ALIMENTAIRE.....	43
FIGURE 14 : APPORT ALIMENTAIRE HEBDOMADAIRE CUMULE	44
FIGURE 15 : COURBE DE SUIVI DU POIDS CORPOREL DES ANIMAUX	45
FIGURE 16 : COMPARAISON DES PRISES DE POIDS CORPOREL.....	46
FIGURE 17 : SUIVI DE LA CROISSANCE EN LONGUEUR DES OS.....	47
FIGURE 18 : PARAMETRES DE MICROARCHITECTURE OSSEUSE A BASELINE.....	49
FIGURE 19 : PARAMETRES D'ADIPOSITE MEDULLAIRE A BASELINE DANS LES 3 SITES ANALYSES.....	50
FIGURE 20 : ILLUSTRATION 3D DE LA MICROARCHITECTURE OSSEUSE ET DE L'ADIPOSITE MEDULLAIRE.....	50
FIGURE 21 : DROITES DE REGRESSION LINEAIRE DANS LE TIBIA (GROUPE SHAM) A BASELINE	51
FIGURE 22 : PROFIL DE DISTRIBUTION DE L'ADIPOSITE MEDULLAIRE ET RELATION AVEC LA SURFACE OSSEUSE TRABECULAIRE.....	52
FIGURE 23 : PARAMETRES DE MICROARCHITECTURE OSSEUSE DANS LE GROUPE SHAM AU COURS DU TEMPS (BASELINE, M4 ET M9)	54
FIGURE 24 : PARAMETRES D'ADIPOSITE MEDULLAIRE DANS LE GROUPE SHAM AU COURS DU TEMPS (BASELINE, M4 ET M9)	54
FIGURE 25 : PARAMETRES DE MICROARCHITECTURE OSSEUSE A M4 ET M9 DANS LE TIBIA	56
FIGURE 26 : PARAMETRES DE MICROARCHITECTURE OSSEUSE A M4 ET M9 DANS L'OS ALVEOLAIRE	58
FIGURE 27 : PARAMETRES DE MICROARCHITECTURE OSSEUSE A M4 ET M9 DANS LE CONDYLE.....	59
FIGURE 28 : PARAMETRES D'ADIPOSITE MEDULLAIRE DANS LES 3 SITES A M4 ET M9.....	60
FIGURE 29 : DROITES DE REGRESSION LINEAIRE DANS LE TIBIA AU SEIN DES GROUPES OVX.	61
FIGURE 30 : DISTRIBUTION DE L'ADIPOSITE MEDULLAIRE AU SEIN DE CHAQUE SITE A M4 ET M9	63
FIGURE 31 : REPRESENTATIONS 3D DE LA MICROARCHITECTURE ET DE L'ADIPOSITE MEDULLAIRE APRES MARQUAGE A L'OSMIUM DANS LA METAPHYSE PROXIMALE DU TIBIA A M4 ET M9 DANS LES GROUPES SHAM ET OVX_AL.....	64
FIGURE 32 : REPRESENTATIONS 3D DE LA MICROARCHITECTURE ET DE L'ADIPOSITE MEDULLAIRE APRES MARQUAGE A L'OSMIUM DANS L'OS ALVEOLAIRE A M4 ET M9 DANS LES GROUPES SHAM, OVX_AL ET OVX_PF	65
FIGURE 33 : REPRESENTATIONS 3D DE LA MICROARCHITECTURE ET DE L'ADIPOSITE MEDULLAIRE APRES MARQUAGE A L'OSMIUM DANS LE CONDYLE A M4 ET M9 DANS LES GROUPES SHAM, OVX_AL ET OVX_PF.....	65
FIGURE 34 : RESULTATS GRAPHIQUES DE L'ANALYSE EN COMPOSANTES PRINCIPALES (PCA) POUR LES ECHANTILLONS DE TIBIA A COURT ET LONG TERME ENTRE SHAM ET OVX_AL.	67
FIGURE 35 : COUPE FRONTALE DE TISSU OSSEUX MANDIBULAIRE DE RAT OBSERVEE EN MICROSCOPIE A BALAYAGE LASER.	81
FIGURE 36 : IMAGES MEB DE TISSU OSSEUX (TIBIA, OS ALVEOLAIRE ET CONDYLE), MONTRANT L'HETEROGENEITE DE LA MINERALISATION INTER-SITE	81

LISTE DES ABREVIATIONS

Ad.V :	Volume adipeux (Adipose Volume)
AG :	Acide Gras
BMAT :	Adiposité médullaire (Bone Marrow Adipose Tissue)
BMDD :	Distribution de la densité de minéralisation osseuse (Bone Mineralization Density Distribution)
BMSCs :	Cellules stromales médullaires (Bone Marrow Stromal Cells)
BMU :	Unité structurale élémentaire (Basal Multicellular Unit)
BSE :	Electrons rétro-diffusés (Back-Scattered Electrons)
CSM/MSC :	Cellule Souche Mésenchymateuse / Mesenchymal Stem Cells
CSH/HSC :	Cellule Souche Hématopoïétique / Hematopoietic Stem Cells
CTL :	Contrôle
DA :	Degré d'anisotropie (Degree of anisotropy)
DEXA :	Absorptiométrie biphotonique à rayons X (Dual Energy X-ray Absorptiometry)
DMO :	Densité Minérale Osseuse
EDX :	Analyse dispersive en énergie (Energy-Dispersive X-Ray Spectroscopy)
FWHM :	Largeur à mi-hauteur (Full Width at Half Maximum intensity)
Ma.V :	Volume de moelle (Marrow volume)
MAPK :	Mitogen-Activated Protein Kinases
MEB :	Microscopie Electronique à Balayage
MEC :	Matrice Extra-Cellulaire
MicroCT :	Microtomographie à Rayons X assistée par ordinateur (X-ray Micro Computing Tomography)
ONTF :	Ostéonécrose de la tête fémorale
OB :	Ostéoblastes

OC :	Ostéoclastes
OMS :	Organisation Mondiale pour la Santé
OP :	Ostéoporose
OPG :	Ostéoprotégérine
OPN :	Ostéopontine
OVX :	Ovariectomie
OVX_AL :	Ovariectomie_Sans restriction alimentaire (Ovariectomy_ <i>ad libitum</i>)
OVX_PF :	Ovariectomie_Rationnement alimentaire (Ovariectomy_pair-feeding)
PCA :	Analyse en Composante Principale (Principal Component Analysis)
PMMA :	Polyméthacrylate de méthyle
qBEI :	Imagerie électronique rétrodiffusée quantitative (Quantitative Backscattered Electron Imaging)
RANKL :	Ligand du Récepteur Activateur de NF- κ B (Nucleator Factor-kappa B)
ROI :	Région d'intérêt (Region Of Interest)
RX :	Rayons X
SHAM :	Opération blanche/placebo (SHAM surgery)
SOST :	gène codant pour la sclérostine
T-Score :	Score standardisé utilisé pour exprimer la déviation des valeurs ostéo-densitométriques (selon l'OMS)
Tb.N :	Densité trabéculaire (Trabecular Number)
Tb.Sp :	Distance inter-travées (Trabecular Separation)
Tb.Th :	Epaisseur trabéculaire (Trabecular Thickness)
UCP1 :	Protéine découplante du tissu adipeux brun (UnCoupling Protein 1)
VOI :	Volume d'intérêt (Volume Of Interest)

INTRODUCTION GENERALE

L'ostéoporose post-ménopausique est une maladie fréquente et généralisée du squelette qui se caractérise par une perte de masse osseuse et des altérations multi-échelles « site-spécifiques » de la structure des os, les rendant plus fragiles et plus susceptibles à la fracture (1–3). Ces altérations squelettiques, aussi bien quantitatives que qualitatives, sont décrites le plus souvent au niveau des sites de fractures, à savoir sur les os longs du squelette appendiculaire (extrémité supérieure du fémur en particulier) et les os du squelette axial (vertèbres). En revanche, l'existence d'une ostéoporose du squelette cranio-facial est encore aujourd'hui débattue. La prévalence estimée de l'ostéoporose est située entre 9 et 38% chez les femmes et 1 à 8% chez les hommes soit environ 49 millions d'individus dans le monde (4), dont 5.5 millions atteints en Europe (5). Par ailleurs, les données démographiques et épidémiologiques illustrent un contexte de vieillissement de la population (estimation INSEE pour la France: 70 millions d'habitants en 2050 dont 25% aura alors plus de 60 ans). Cela justifie l'intérêt croissant à mieux connaître les modifications propres liées au vieillissement et aux pathologies qui y sont associées. En particulier, mieux comprendre l'ostéoporose et ses conséquences sur les tissus oraux afin de mieux traiter les besoins de la population gériatrique et maintenir des fonctions orales efficaces le plus longtemps possible reste un enjeu prioritaire (6,7).

L'Organisation Mondiale pour la Santé (OMS) définit l'ostéoporose sur des critères principalement ostéo-densitométriques (T-Score > 2.5 Déviation Standard), évalués à la hanche et au rachis lombaire par absorptiométrie biphotonique à rayons X (DEXA). Le diagnostic positif s'établit sur la base de ces références (8,9). En effet, au cours de l'ostéoporose, un déséquilibre du remodelage osseux conduit à une diminution site-spécifique de la densité minérale osseuse (DMO). Néanmoins, les altérations qualitatives osseuses et la composition adipeuse médullaires ne sont que très peu évaluées en pratique clinique courante, bien qu'elles constituent des signaux d'alerte de la maladie (10,11). Alors que l'ostéoporose dite « primaire » est principalement observée chez les sujets âgés, en particulier chez la femme ménopausée (carence œstrogénique) et en moindre proportion chez les hommes (carence androgénique), on observe également la survenue d'une ostéoporose

« secondaire », aussi bien chez les sujets âgés que chez les sujets jeunes, consécutive à la coexistence de pathologies associées (anorexie mentale, hyperparathyroïdie, ostéogénèse imparfaite...), à une immobilisation prolongée (alitement), à l'absence de pesanteur (voyage dans l'espace), ou encore à l'administration de certains traitements (corticoïdes) (12). Plus récemment, un nombre croissant de publications liées à l'adiposité médullaire reflète un intérêt grandissant à mieux comprendre son implication dans la régulation du métabolisme osseux au sein du micro-environnement ostéo-médullaire (13–18).

L'impact de l'ostéoporose sur la région squelettique cranio-faciale, et en particulier alvéolaire, demeure encore aujourd'hui sujet à controverse (19). Les os constitutifs de cette région (maxillaire et mandibule), qui hébergent les organes dentaires, présentent des spécificités anatomiques (répartition cortico-spongieuse) et fonctionnelles (activité masticatoire) par rapport aux autres os du squelette. Bien que les données semblent contradictoires selon les études, une corrélation positive a été rapportée entre la densité minérale osseuse (DMO) évaluée par DEXA à la hanche chez des patientes atteintes d'ostéoporose post-ménopausique et la DMO évaluée par scanner au niveau de l'os alvéolaire à mi-hauteur de la 1^{ère} molaire et de l'os basal mandibulaire après ajustement avec l'âge, l'origine ethnique, les antécédents de substituts hormonaux et calciques ou encore le tabac (20,21). Une corrélation faible entre la DMO mesurée à la hanche et au rachis et l'épaisseur corticale mandibulaire mesurée à partir de panoramiques dentaires ou de radiographies intra-orales a été montrée dans l'étude multicentrique européenne OSTEODENT, conduite au sein d'une large cohorte de 665 femmes ménopausées (22,23). Concernant le lien entre la DMO et la perte des dents, les données de la littérature sont contradictoires et peu nombreuses. Néanmoins, dans l'étude OSTEODENT, il a été retrouvé un nombre de dents perdues plus élevé chez les patientes ostéoporotiques en comparaison avec les femmes ostéopéniques ou présentant une DMO normale (24,25). Dans ce contexte, nous émettons l'hypothèse que les mécanismes à l'origine de la perte osseuse au cours de l'ostéoporose pourrait être déclenchée par des variations du contenu adipeux médullaire en site mandibulaire ; paramètre insuffisamment exploré cliniquement mais rapportée comme pouvant constituer un potentiel marqueur précoce de la survenue et de la progression de la pathologie.

CHAPITRE 1 : ETAT DE L'ART

Les tissus osseux et médullaires constituent des tissus conjonctifs hautement spécialisés qui présentent, par leur action synergique, trois fonctions principales (26,27) :

1. un rôle biomécanique assurant la protection mais aussi le soutien et la mobilité du corps en association avec les muscles squelettiques.
2. un rôle métabolique via un remodelage permanent tout au long de la vie, assuré par les ostéoblastes (OB) et les ostéoclastes (OC), issus des précurseurs médullaires.
3. un rôle dans l'hématopoïèse assuré par la moelle où siège la synthèse des lignées cellulaires du sang et le stockage des cellules progénitrices (hématopoïétiques et mésenchymateuses) (28).

Le tissu osseux possède une organisation structurale composite et multi-échelle qui contribue à assurer ses fonctions majeures. Cette organisation hiérarchisée permet aussi une certaine déformation, nécessaire à assurer ses fonctions biomécaniques (29).

I. La mandibule : un os spécifique ?

La mandibule, os irrégulier impair constituant la partie antéro-inférieure du squelette cranio-facial, est une entité du squelette axial qui assure, avec le maxillaire, l'ancrage des organes dentaires grâce aux tissus parodontaux : os alvéolaire, ligament alvéolo-dentaire, cément radiculaire (30,31). Cette interface dynamique et labile constitue une articulation fibreuse spécifique (gomphose) et représente une caractéristique fonctionnelle unique au sein du squelette (32,33). La mandibule est composée d'un corps mandibulaire en forme d'arcade dans le plan horizontal (secteur denté) et de branches montantes postérieures ou ramus (secteur non denté) à l'aplomb desquelles est située la zone articulaire condylienne avec la base du crâne au niveau de l'os temporal (Fig. 1). Le corps mandibulaire est divisé topographiquement en deux parties : le processus alvéolo-dentaire (os alvéolaire),

support des dents et l'os basal au-delà des apex dentaires (34). Dans la mandibule, l'ossification est mixte à partir du cartilage de Meckel avec un mode d'ossification enchondral au niveau du ramus et du condyle et un mode d'ossification intra-membraneux au niveau du corps mandibulaire (os alvéolaire et basal).

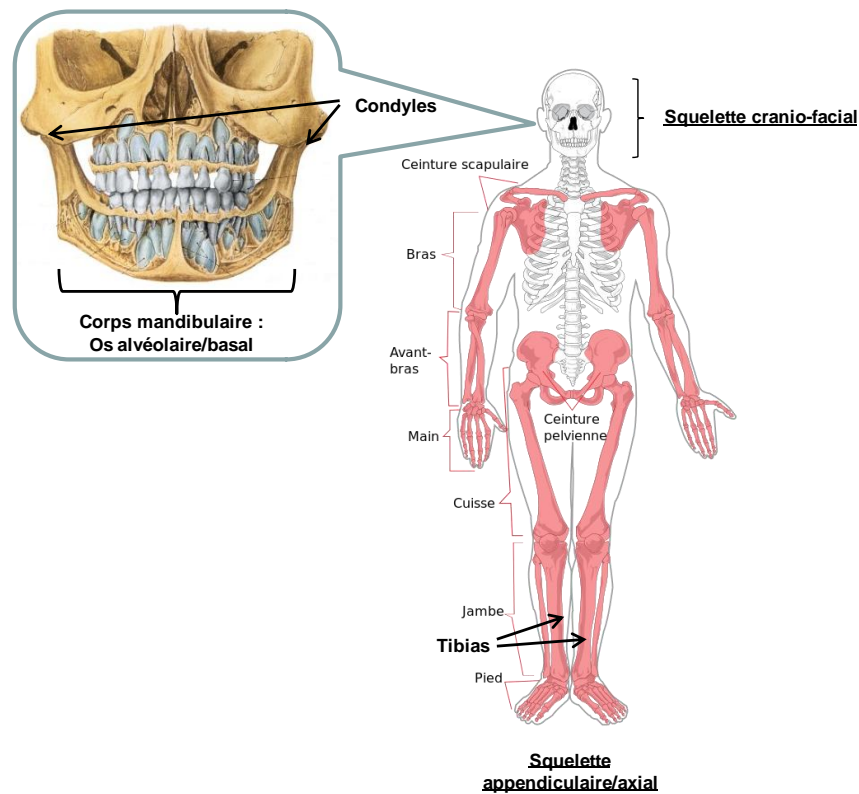



Figure 1 : Squelette axial et appendiculaire : Morphologie du squelette mandibulaire humain (diphyodontie), images libres de droit (licence creative commons )

La microarchitecture osseuse et les propriétés structurales de l'os alvéolaire et du condyle varient au cours de la morphogenèse dento-alvéolaire (35), mais aussi en réponse au stress mécanique chronique exercé par l'activité masticatoire (36), à l'hypofonction occlusale (édentement, consistance des aliments ingérés, malnutrition (37,38)), au mouvement/déplacement des dents (39–41) ou encore à la perte des dents (42). Ces modifications résultent d'un remodelage constant influencé par des facteurs locaux (occlusaux) et systémiques (hormonaux) (43). Le turn-over alvéolaire a été décrit comme étant jusqu'à 4 fois supérieur à celui de l'os basal (44–46). Aussi, l'os alvéolaire se caractérise par une résorption physiologique irréversible après la perte d'un organe dentaire : remaniement post-extractionnel (47).

Sur le plan embryologique, le squelette cranio-facial se distingue par une origine propre issue des crêtes neurales (ectodermique), à la différence des autres os du squelette axial et appendiculaire (mésodermique) (48,49). Après co-culture d'un nombre identique de cellules progénitrices issues des crêtes neurales et du mésoderme, Leucht *et al.* ont rapporté une plus grande capacité de prolifération des cellules progénitrices mésodermiques mais une capacité de différenciation plus rapide des cellules progénitrices issues des crêtes neurales. Ces spécificités, à l'origine d'un potentiel ostéogénique supérieur des cellules progénitrices issues des crêtes neurales, ont été confirmées *in vivo* par des expériences de greffe homo/hétérotopiques de cellules progénitrices dans la mandibule et le tibia après lésion osseuse standardisée chez le rongeur (50). De plus, ces cellules issues des crêtes neurales sont caractérisées par une plasticité remarquable, y compris chez l'adulte, se traduisant par l'adoption d'un phénotype cellulaire adapté à l'environnement local dans lequel elles sont greffées. Cette propriété a été confirmée dans un modèle animal de cicatrisation (enchondral) après fracture mandibulaire provoquée dans lequel les cellules progénitrices recrutées se différencient en chondrocytes.

Par ailleurs, les données de l'anatomie comparée et de la biologie de l'évolution rapportent que les os du squelette cranio-facial issus du 1^{er} arc pharyngé, en particulier la mandibule, n'expriment pas les gènes de développement « Hox », inhibiteurs de la formation osseuse des maxillaires (51–53). Or, l'expression combinée de ces gènes Hox, bien conservée chez les espèces, intéressent tous les autres os du squelette au cours du développement. L'analyse du transcriptome de la mandibule montre que, bien que la majorité des transcrits (84%) soient communs entre la mandibule et les os longs (54), les différences de profil d'expression régulant la formation osseuse des lignées cellulaires issues de chaque localisation squelettique pourraient expliquer l'impact différentiel sur le remodelage osseux, la réparation post-fracturaire mais aussi la microarchitecture osseuse entre les sites squelettiques (55,56). De plus, chez la souris comme chez le rat, l'expression de protéines matricielles amélaire (amélogénine, améloblastine) dans l'os alvéolaire pourrait également contribuer à expliquer les spécificités microarchitecturales osseuses et les différences de niveau de minéralisation en site mandibulaire, en

particulier un volume osseux et une épaisseur des travées plus importants ainsi qu'une densité trabéculaire plus élevée que celle des os longs (57,58).

Le squelette cranio-facial, en particulier maxillaire et mandibulaire, se distingue donc par une **origine embryologique distincte** (ectoblastique), un **mode d'ossification mixte** (intra-membraneux au niveau du corps mandibulaire et endochondral au niveau du condyle), une **croissance interne centrée sur les** dérivés ecto-mésenchymateux à l'origine des **futurs organes dentaires**, et un **turn-over osseux élevé** et modulé localement par les sollicitations fonctionnelles dentaires.

1. Relation ostéo-médullaire dans la mandibule

Sur le plan structural, la mandibule présente une répartition osseuse cortico-spongieuse hétérogène (corps mandibulaire, ramus, condyle) mais aussi une variation de sa longueur et de son épaisseur au cours de sa formation et des sollicitations fonctionnelles qui contribuent de manière inégale à sa solidité (59). L'os trabéculaire se caractérise par des travées osseuses interconnectées formant un réseau tridimensionnel au contact du tissu médullaire. Dans la mandibule, ce réseau trabéculaire a une densité relative élevée (50-70% vs 10-50% dans les os longs). Son rôle est essentiellement métabolique du fait de sa surface d'échange importante avec les tissus interstitiels et en raison de son remaniement plus rapide (d'un facteur 4 à 5) par rapport à l'os cortical. Il participe également aux propriétés mécaniques par sa résistance à la compression (60). L'os cortical possède une structure plus compacte assurant essentiellement un rôle de protection contre les stimulations mécaniques avec une densité relative moyenne dans la mandibule de 85 à 95%. La porosité corticale est principalement due à la présence de vaisseaux sanguins mais aussi à l'interconnexion des cellules ostéocytaires. Avec un turnover plus lent (~1-2%/an), il diffère également de l'os trabéculaire par une maturité tissulaire plus importante (61). Les paramètres micro-architecturaux trabéculaires et corticaux, analysés par microtomographie à rayons X (microCT), sont modifiés de manière site-spécifique au cours du temps, de l'activité du remodelage et de divers contextes physiopathologiques tels que l'ostéoporose (62).

Le micro-environnement médullaire participe à ces modifications de la microarchitecture par l'action régulatrice des constituants de la moelle osseuse dans la balance ostéo-formation/ostéo-résorption (63,64). Parmi les constituants de la moelle osseuse, les adipocytes médullaires sont les cellules stromales différenciées les plus abondantes de la moelle osseuse adulte humaine (65). Bien que la moelle osseuse mandibulaire contienne une proportion en cellules stromales médullaires (BMSCs) inférieures aux os longs, divers auteurs ont rapporté des caractéristiques uniques de ces BMSCs au niveau oro-facial (66,67). En effet, comparativement à leurs homologues au niveau de la crête iliaque, les BMSCs humaines mandibulaires et maxillaires prolifèrent plus rapidement, ont une sénescence retardée, expriment des taux plus élevés de phosphatase alcaline et accumulent davantage de calcium *in vitro*. Ces cellules forment également plus d'os *in vivo* et sont plus sensibles aux inductions ostéogéniques (68). De plus, d'autres auteurs ont montré que les BMSCs mandibulaires présentent un potentiel ostéogénique supérieur, ainsi qu'un potentiel adipogénique inférieur comparativement à leurs homologues en site iliaque (69) et dans le tibia (70). Les BMSCs maxillaires et mandibulaires traitées avec de l'adiponectine orientent leur différenciation préférentiellement vers la voie ostéogénique par activation de la voie de signalisation des Mitogen-Activated Protein Kinases (MAPK), impliquée dans le métabolisme des acides gras (76). Ces nombreuses interactions au sein de la niche ostéo-médullaire mandibulaires, impliquant l'adiposité médullaire et ses médiateurs comme acteur paracrine/endocrine (77,78) démontrent l'intérêt à mieux comprendre la formation et la fonction de l'adiposité médullaire en site mandibulaire.

La différenciation et le devenir de ces BMSCs peuvent également être régulés localement par la matrice osseuse via les ostéocytes (71,72), principales cellules mécano-sensorielles du tissu osseux dont la densité reflète le niveau de remodelage osseux (73,74). Dans la mandibule, la sécrétion de sclérostine par les ostéocytes matures en réponse à l'hypofonction occlusale (modèle d'édentement chez le rat) ou à la déficience hormonale en œstrogène (modèle d'ovariectomie) induit une adipogénèse accrue associée à une inhibition de la formation osseuse via l'inactivation de la voie Wnt/ β -catenin dans les BMSCs (inhibition de la différenciation des BMSCs en OB matures) et conduit ainsi à une perte osseuse (75). La diminution de sécrétion de sclérostine *in vivo* par des méthodes génétiques ou

pharmaceutiques ou encore par stress mécanique, entraîne une moindre adiposité médullaire, suggérant un rôle direct du gène codant pour la sclerostin (SOST) dans la régulation du devenir des progéniteurs adipocytaires issus de la moelle osseuse (71,72,75).

Ce qu'il faut retenir :

La mandibule un os spécifique ?

- ✓ Os irrégulier doté d'une microarchitecture cortico-spongieuse dense.
- ✓ Interface dynamique os alvéolaire-dent par une articulation de type gomphose, unique au sein du squelette.
- ✓ Taux de remodelage élevé.
- ✓ Différenciation préférentielle des BMSCs mandibulaires vers la voie ostéogénique.
- ✓ Capacité de différenciation plus rapide des BMSCs mandibulaires vs BMSCs tibiales.

II. L'adiposité médullaire : nouvel acteur dans l'homéostasie osseuse ?

1. Origine de l'adiposité médullaire (BMAT)

L'adiposité médullaire a été décrite initialement par des anatomistes à la fin du XIX^{ème} siècle. Les premières constatations de la moelle chez des individus décédés des suites d'une intoxication arsenicale font état d'une infiltration graisseuse médullaire importante associée à une pénurie des constituants hématopoïétiques (79). Ces observations, longtemps mises de côté, ont repris de l'intérêt dans la seconde moitié du XX^{ème} siècle avec le développement de la chimiothérapie dans le cadre de pathologies hémorragiques (anémie aplasique) et la découverte d'une relation étroite entre les adipocytes médullaires et les cellules sanguines (80). Diverses études ont ensuite décrit une relation inverse entre le contenu adipeux médullaire et l'activité hématopoïétique (81,82), émettant l'hypothèse que cette infiltration adipeuse était une réserve métaboliquement inactive comblant l'espace inoccupé par les cellules sanguines. L'intimité de contact entre les cellules osseuses et les cellules adipeuses de la moelle constitue une cohabitation unique chez les mammifères (83,65,84,85,77). Bien que leurs fonctions soient différentes, ces cellules proviennent d'une même cellule progénitrice : la cellule souche mésenchymateuse (CSM) (Fig.2).

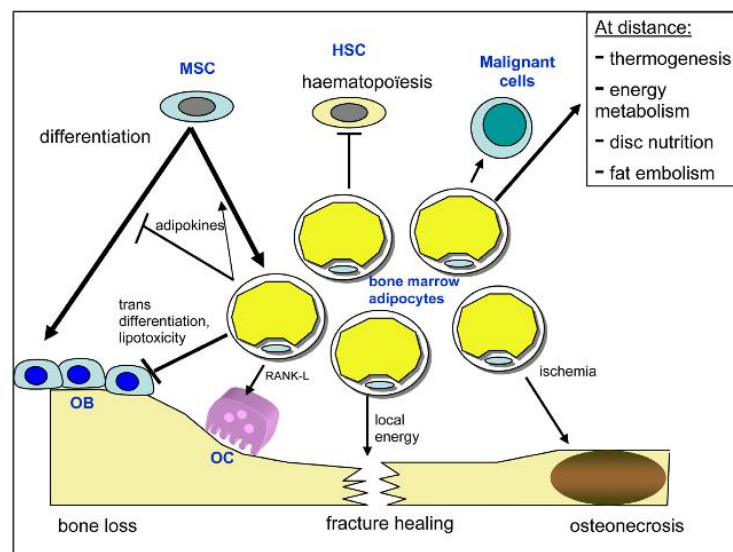


Figure 2 : Principaux rôles attribués aux adipocytes médullaires (Hardouin.P, 2012)

Malgré les progrès réalisés ces dernières décennies, notamment grâce à l'imagerie, de nombreuses questions relatives à l'adiposité médullaire demeurent, en particulier :

1. L'origine des adipocytes médullaires est toujours controversée (capacité des cellules bordantes de se différencier en adipocyte non démontrée à ce jour).
2. Les mécanismes qui régulent la conversion adipeuse médullaire.
3. Les caractéristiques phénotypiques des adipocytes médullaires restent mal connues à ce jour (18)

2. Adipogenèse et différenciation adipocytaire

La conversion adipeuse (moelle rouge-moelle jaune) physiologique comme induite par divers contextes pathologiques est connue de longue date (86,87). Au sein de la moelle du squelette appendiculaire et axial, la répartition moelle rouge (hématopoïétique)/moelle jaune (adipeuse) est hétérogène (88–93). A la naissance principalement hématopoïétique, la moelle osseuse est composée majoritairement de graisse chez l'adulte, représentant jusqu'à 70% du volume de moelle, soit 5 à 10% du poids total de masse grasse de l'organisme (94,95). La moelle adipeuse présente dès la naissance (constitutive) au niveau des sites distaux du squelette appendiculaire est préservée chez les vertébrés (ex : souris, rats, lapins et humains) (96). Après la puberté, le taux de renouvellement adipocytaire est relativement faible, évalué à moins de 10%/an (97). Cette conversion adipeuse médullaire progressive avec l'âge pourrait traduire un mécanisme compensatoire au cours duquel les BMSCs s'engagent dans une voie de différenciation adipogénique plutôt qu'ostéogénique. Cependant, les mécanismes régulant cette balance adipogenèse/ostéogenèse restent mal connus (98–101). Cette conversion adipeuse médullaire a été étudiée initialement de manière empirique par Emery et Follett, hématologues, avant et après la naissance de nouveaux-nés prématurés ne présentant aucune dyscrasies sanguines ni déformations cardiaques au niveau de prélèvements nécropsiques des 2èmes orteils (102). Ils ont rapporté d'importantes modifications volumiques des cavités médullaires d'un individu à un autre et ont décrit une conversion adipeuse médullaire débutant généralement avant le terme (40 semaines d'aménorrhée), plus marquée entre 6 et 10 semaines après la naissance

au niveau de cette extrémité du squelette, jusqu'au remplacement graisseux intra-médullaire presque complet à partir de 8 mois-1 an. Dans la mandibule, la conversion adipeuse médullaire a été décrite par Yamada et al., comme étant plus tardive dans le condyle par rapport au corps mandibulaire (103). Burkhardt *et al.* ont rapporté une diminution du volume osseux trabéculaire et du nombre de capillaires intra-médullaires en site iliaque associée à une augmentation de l'adiposité médullaire avec l'âge, l'anémie et l'ostéoporose, confirmant ainsi les premières observations de Meunier en 1971 (81). De plus, ces variations ostéo-médullaires étaient négativement corrélées avec les paramètres de résorption osseuse dans le cas de fractures associées, laissant suggérer une relation étroite entre remodelage osseux, vascularisation et hématopoïèse et adiposité médullaire (104). Les adipocytes varient en taille et en nombre dans divers contextes de dysplasie médullaire. En parallèle, une hématopoïèse accrue stimule la lipolyse des précurseurs hématopoïétiques (105). Dans le modèle de sénescence accélérée chez la souris (SAMP), une augmentation de l'adipogenèse associée à une diminution de l'ostéoblastogenèse a été rapportée dans le fémur et le tibia, laissant suggérer un « switch » dans la différenciation des cellules progénitrices de la moelle osseuse au cours du vieillissement provoqué (106).

L'adipogenèse médullaire est un processus dynamique et adaptatif aux besoins énergétiques, et elle peut être modulée en fonction des conditions locales au sein de la niche médullaire mais aussi systémique. Chez les patientes atteintes d'anorexie mentale, malgré l'absence de graisse périphérique, la moelle osseuse est remplie d'adipocytes (107). La régulation centrale de l'adipogenèse médullaire a été étudié dans le modèle de rats hypophysectomisés dans lequel la déficience en hormone de croissance conduit à une augmentation des lipides osseux (triglycérides et cholestérol) et de l'adiposité médullaire (108). Aussi, au cours de certaines situations physiologiques (sujets obèses, marathoniens, fumeurs) comme pathologiques (anémies chroniques, hémopathies malignes : leucémies aiguës/myélome), une reconversion médullaire (moelle jaune-moelle rouge) associée à une augmentation du volume médullaire dans le squelette appendiculaire et axial a été rapportée, y compris dans le squelette cranio-facial (100,109). Les mécanismes centraux et locaux qui régulent cette conversion/reconversion adipeuse médullaire au cours du temps sont encore aujourd'hui mal connus.

3. Caractéristiques phénotypiques des adipocytes médullaires

En parallèle, de nombreux travaux ont été conduits pour caractériser les propriétés phénotypiques de cette population cellulaire qui demeure encore largement sous-étudiée. Ainsi, en 1976, Tavassoli a identifié deux types d'adipocytes médullaires : ceux disséminés au sein de la moelle rouge, qui disparaissent en réponse à l'expansion du tissu hématopoïétique suite à une hémolyse, et les autres, semblables aux adipocytes blancs extra-médullaires et regroupés en amas plus compacts, constituant la moelle jaune (86,110). Les adipocytes médullaires divergent ainsi quant à leur phénotype et à leur réponse aux stimuli en fonction de leur localisation dans l'os et la moelle.

Scheller *et al.* ont décrit, plus récemment, deux types d'adiposité médullaire chez les rongeurs avec des caractéristiques uniques selon la souche considérée (souris C3H/C57Bl6) : une adiposité dite « constitutive », présente dès la naissance et localisée dans les extrémités distales et les vertèbres caudales, et une adiposité « régulée », adjacente à la moelle hématopoïétique et localisée dans les extrémités proximales ; cette dernière ayant la capacité de se contracter en réponse à des stimuli environnementaux et nutritionnels (16,111).

Les adipocytes médullaires matures accumulent dans leur cytoplasme, représentant ~90% du volume cellulaire (112), des triglycérides (AG saturés) avec un degré de lipotoxicité élevé (113,114). Ils sécrètent aussi des adipokines dont le rôle complexe sur le métabolisme osseux a été récemment évoqué : l'adiponectine (78), la leptine (115,116) ou encore la chémérine (117). La libération de ces facteurs paracrines a une action modulatrice dans le micro-environnement médullaire local, sur l'hématopoïèse mais aussi sur le recrutement et la différenciation des OB et des OC (118,119).

4. Propriétés connues des adipocytes médullaires

L'étude des adipocytes médullaires chez l'Homme et chez les animaux a contribué à définir l'adiposité médullaire comme un tissu spécifique et labile (capable de trans/dé-différenciation), distinct des autres amas adipeux jusqu'alors référencés (adipocytes blancs sous-cutanés, péri-viscéraux, adipocytes bruns) (119) caractérisé par :

- ✓ Une **conversion physiologique lente** à partir de la naissance, voire légèrement avant qui se poursuit jusqu'au remplacement de tout ou partie du tissu hématopoïétique selon les sites squelettiques.
- ✓ Une **localisation site-spécifique** (96,120,121).
- ✓ Une **composition cellulaire particulière**, adipocytes chargés en lipides **plus ou moins saturés** (coloration positive à la périlipine) et distincts de simple dépôt de gouttelettes lipidiques.(113,122).
- ✓ Une **adipogénèse adaptative et dynamique** face aux stimuli métaboliques (ex : high fat diet, obésité, malnutrition, anorexie mentale), hormonaux (ex : carence oestrogénique, diabète, absence de signalisation par la PTH), thérapeutiques (post-chimiothérapie) ou environnementaux (ex : exposition au froid, immobilisation prolongée) (88,98,99,123–125).
- ✓ l'**expression de marqueurs** aussi bien **adipeux** qu'**osseux**, notamment le ligand du récepteur activateur de NF- κ B (RANKL) (126) mais pas ceux des adipocytes bruns : les adipocytes médullaires n'expriment pas la protéine découplante du tissu adipeux brun (UCP1).
- ✓ un **déséquilibre de la balance ostéo-formation/ostéo-résorption** dans le cas d'infiltration adipeuse médullaire au profit de la résorption et aux dépens de la formation (104,127).
- ✓ une **action métabolique endocrine** par la sécrétion d'adipokines (adiponectine, leptine, chémérine notamment) (78,128–131).

5. Distribution squelettique de l'adiposité médullaire

Au cours des dernières décennies, les tissus adipeux ont révélé leur diversité de composition cellulaire, de localisation anatomique et de fonctions (83). Parmi les dépôts graisseux de l'organisme, le tissu adipeux de la moelle osseuse se distingue comme un dépôt unique au regard de la taille, la distribution et la fonction métabolique des adipocytes (14,111). La présence de ce tissu adipeux et sa conversion physiologique dans la moelle osseuse était connue de longue date grâce à l'histomorphométrie et à l'IRM mais a été étonnamment peu étudiée dans le squelette cranio-facial.

La répartition de l'adiposité médullaire dans le squelette est un processus étroitement régulé avec des spécificités de sites. Chez les rongeurs, le contenu et la composition de l'adiposité médullaire ont été rapportés comme étant répartis différemment entre la métaphyse distale et proximale du tibia (96) mais également entre les vertèbres lombaires et caudales. En revanche, très peu de données sont disponibles quant au contenu adipeux médullaire et à sa distribution en site mandibulaire. Dans la mandibule, deux zones fonctionnelles caractérisées par un remodelage osseux élevé ont été identifiées chez le rat : la crête alvéolaire et le condyle (132). Yamada *et al.* ont établi que la conversion de la moelle hématopoïétique à la moelle grasse chez les jeunes sujets se produit d'abord dans le corps mandibulaire, suivi par le ramus, et enfin dans le condyle (103). Le contenu adipeux médullaire au niveau de la mandibule, en présence ou en absence de dents, demeure à ce jour inconnu chez les adultes, limitant notre compréhension des mécanismes mis en jeu au cours du vieillissement, mais aussi des nombreuses pathologies ostéorésorbantes telles que l'ostéoporose ou encore les maladies parodontales. Bien que l'origine, le développement et la fonction de l'adiposité médullaire soient partiellement élucidés, son importance dans les interactions os-graisse est aujourd'hui d'un intérêt clinique grandissant (15,133). Les données cliniques montrent que la composition adipeuse médullaire joue également un rôle dans l'homéostasie du squelette (134–136). Des études récentes, chez l'Homme comme dans les modèles animaux, suggèrent une relation proportionnelle entre la

quantité d'adiposité médullaire et la survenue de diverses pathologies ostéo-résorbantes (122,137).

Par ailleurs, au cours du vieillissement, une augmentation du contenu adipeux médullaire a été observée en site iliaque et rapportée comme étant inversement corrélée au volume osseux trabéculaire (88). L'activité de remodelage osseux semble être modulée par le microenvironnement médullaire local adjacent à la surface de l'os trabéculaire (113,138). L'importance de la signalisation paracrine du tissu adipeux médullaire, démontrée au sein de notre laboratoire par co-culture *in vitro*, suggère que les adipocytes peuvent affecter les cellules osseuses de voisinage en favorisant leur trans-différenciation (ou reprogrammation) (139). De plus, Li *et al.* rapportent que les sites squelettiques avec une composition principalement adipeuse, comme les vertèbres caudales ou le tibia distal, ne subissent pas d'ostéopénie trabéculaire (140). Compte tenu de cette variabilité, la relation entre les modifications de microarchitecture osseuse et la proximité du contenu adipeux médullaire semble devoir être appréhendée de façon distincte selon le site. Cependant, la difficulté d'accéder au contenu adipeux médullaire *in vivo* de manière non invasive freine notre compréhension de son implication suggérée dans la perte osseuse.

Ce qu'il faut retenir :

l'adiposité médullaire : nouvel acteur dans l'homéostasie osseuse ?

- ✓ Il existe une corrélation négative entre la DMO et le contenu adipeux médullaire.
- ✓ Distribution de l'adiposité médullaire différente au sein du squelette et au sein d'un os.
- ✓ Discrimination des différents profils d'adipocytes médullaires et de leur impact sur la physiopathologie osseuse non connus ce jour.

III. Implication de l'adiposité médullaire dans la perte osseuse ?

1. Mécanismes généraux de perte osseuse au cours du vieillissement et de l'ostéoporose

La perte osseuse résulte d'un déséquilibre du remodelage osseux avec des mécanismes physiopathologiques distincts au cours du vieillissement et de l'ostéoporose. Dans les deux cas de perte osseuse, la différenciation des cellules progénitrices au niveau trabéculaire est influencée par le microenvironnement local médullaire (141).

Dans le cadre de l'ostéoporose post-ménopausique, une résorption osseuse accrue liée à une augmentation du nombre d'OC et de leur recrutement associée à une augmentation du nombre d'OB non fonctionnels et à leur apoptose a été rapportée (142). La perte osseuse résultant de cette résorption osseuse plus importante est d'abord rapide (143–145). Chez la femme, dans les 5-10 ans qui suivent la ménopause, la perte osseuse trabéculaire est estimée à ~4 à 6%/an (associée à une perte de la connectivité et de la densité trabéculaire) et la perte osseuse corticale est évaluée à ~1-2%/an. Après cette période, la perte osseuse cortico-spongieuse est plus lente (~1-2%/an) dans les 2 compartiments.

2. Place de l'adiposité médullaire dans la perte osseuse

Chez l'Homme, la quantité d'adiposité médullaire est inversement corrélée à la quantité d'os dans les os longs (squelette appendiculaire) et les vertèbres (squelette axial) dans un certain nombre de contextes physiopathologiques : vieillissement (88), immobilisation prolongée (146), ostéonécrose de la tête fémorale (ONTF) (147), ostéoporose post-ménopausique (122,148,149), anorexie mentale (150,151), myélome multiple et autres hémopathies malignes (152–154). Une corrélation positive entre le volume de moelle osseuse et la surface de résorption osseuse a été décrite après analyse histomorphométrique de biopsies de crêtes

iliaques issues de sujets atteints de fracture de la hanche. Paradoxalement, dans cette même population d'étude, une corrélation négative faible a également été rapportée entre le contenu adipeux médullaire et la surface de résorption osseuse (104). Cette augmentation d'adiposité médullaire est également rapportée dans de nombreux modèles animaux de vieillissement (106), d'ovariectomie (155), de restriction calorique (156) ou d'administration de glucocorticoïdes (157). L'adiposité médullaire est donc considérée comme un marqueur pertinent de l'intégrité et de la solidité osseuse. Cependant, les variations de localisation anatomique et les difficultés de visualisation de l'adiposité médullaire ont limité la compréhension de son implication potentielle dans la physiopathologie osseuse.

Par ailleurs, la composition lipidique des adipocytes médullaires impacte la perte osseuse. Les apports en graisses issus de l'alimentation favorisent le stockage d'acides gras (AG) dans le cytoplasme des adipocytes médullaires. Le degré d'insaturation des AG et de ses dérivés peut avoir des effets lipotoxiques importants sur la qualité osseuse (113,158–161). En effet, la DMO a été rapportée comme étant négativement corrélée à la teneur en graisses saturées (162). Ceci a été confirmé par Li *et al.* qui rapportent par spectro-IRM un niveau de graisse saturée plus élevé dans la moelle osseuse de sujets ayant une DMO faible, suggérant qu'une meilleure compréhension de la relation entre la composition de la moelle osseuse et la qualité osseuse chez l'Homme pourrait permettre d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques pour la préservation osseuse (163). Dans le modèle de la ratte ovariectomisée, la teneur en chaîne polyinsaturée et ses métabolites issue de l'alimentation, connues pour leurs rôles dans les processus inflammatoires, sont impliqués dans la régulation du métabolisme osseux en modulant la prolifération et la différenciation des cellules progénitrices (164,165). De plus, Belury *et al.* ont montré que la supplémentation en acide linoléique (AG polyinsaturé) conduit chez la souris à une diminution de la fraction adipeuse et un gain de masse osseuse (166–169).

3. Rôle de l'adipocyte médullaire dans la perte osseuse

L'adiposité médullaire est suspectée contribuer à un déséquilibre du remodelage osseux par divers mécanismes : le processus d'adipogenèse (82,148), ou encore l'activité endocrine (170–172) et paracrine des adipocytes médullaires (126). Les adipocytes médullaires sont capables de sécréter RANKL qui favorisent le recrutement d'OC et le maintien de l'activité ostéoclastique (126) et PPAR γ qui favorise la différenciation adipogénique des précurseurs médullaires (173). RANKL, essentiel à la survie et à la fonction des OC et à la résorption osseuse, est également augmenté en situation de déficience œstrogénique.

La colocalisation des adipocytes et des ostéoblastes est importante. Il existe de plus en plus de preuves d'une trans-différenciation des OB en adipocytes à proximité de la surface osseuse (effet paracrine local). En effet, une sécrétion de marqueurs adipogéniques, tels que la leptine ou la lipoprotéine lipase, associée à une baisse de sécrétion de marqueurs ostéogéniques, tels que l'ostéocalcine par les ostéoblastes a pu ainsi être rapportée, illustrant un dialogue local actif entre OB et adipocytes (139).

Parmi les adipokines sécrétées par les adipocytes médullaires, les travaux de Muragandan *et al.* ont montré que des taux élevés de chémérine sont retrouvés chez les patients obèses, ostéoporotiques ou encore atteints de diabète de type 2 (117). Ainsi, un contexte dyslipidémique mimé par l'administration d'un régime riche en AG (high fat diet) chez les rongeurs ou chez des souris diabétiques (modèle db/db) conduit dans la mandibule à une activité ostéoclastique plus importante, à la présence plus abondante de cathepsine K dans le fluide gingival, ainsi qu'à une perte osseuse (174). De même, la leptine, adipokine sécrétée par les adipocytes, protège de la perte osseuse constatée après ovariectomie chez le lapin en inhibant l'expansion du tissu adipeux médullaire (115,175).

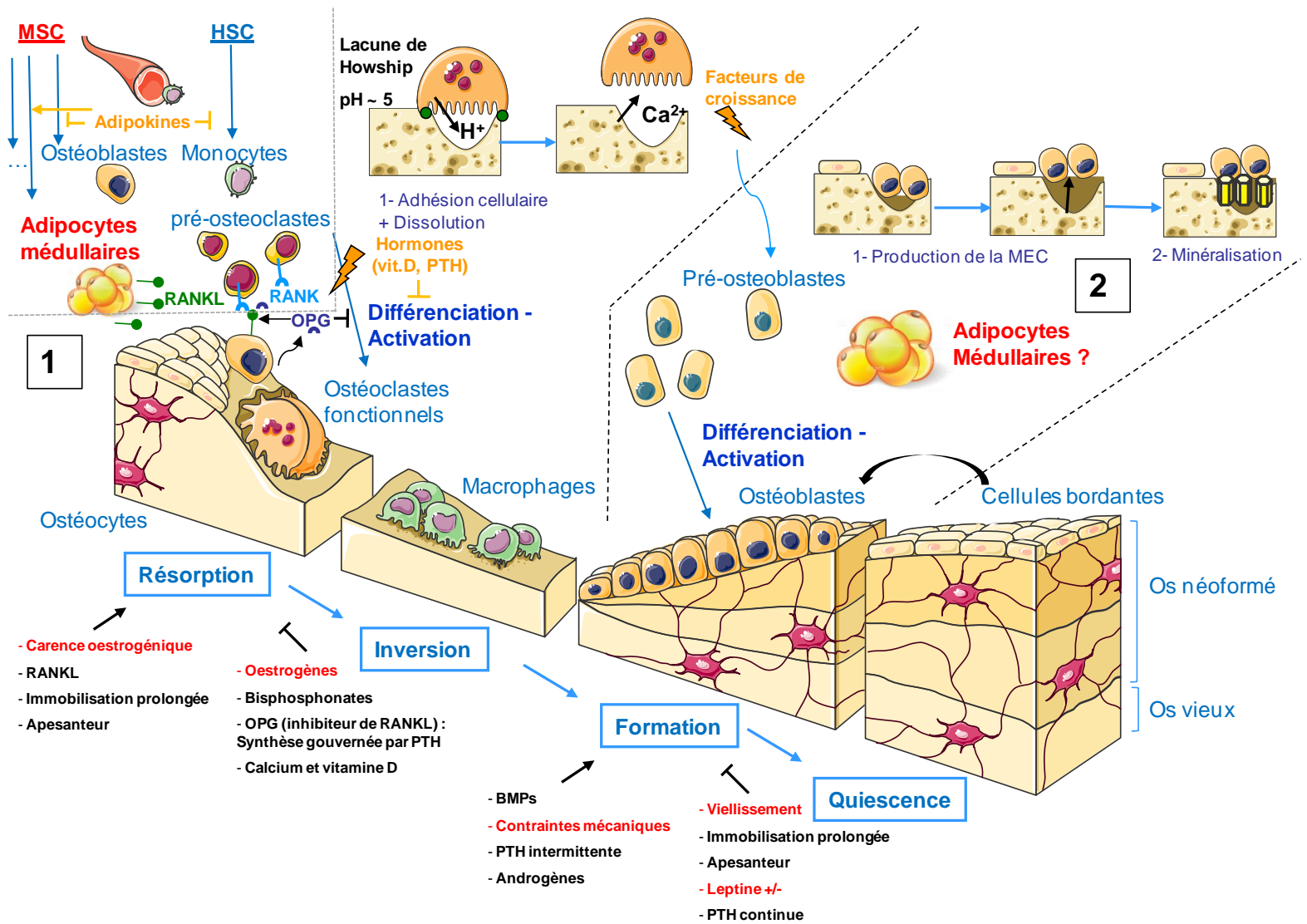


Figure 3 : Principaux facteurs régulant la balance résorption/formation au cours du remodelage osseux : place de l'adiposité médullaire dans la résorption (1) et la formation (2) osseuses, (schéma personnel, adapté de Pascaud)

4. Modèle de la ratte adulte ovariectomisée

Le rat est un modèle classiquement reconnu pour évaluer la microarchitecture osseuse dans de nombreux contextes physiopathologiques (176). La ratte ovariectomisée est le modèle préclinique de choix pour l'étude des altérations de la DMO et de la microarchitecture osseuse liée à l'ostéoporose post-ménopausique (177,178). Sur le plan physiologique, les rattes de souche Sprague-Dawley atteignent leur maturité sexuelle ainsi que leur pic de masse osseuse à l'âge de 12 semaines (3 mois). Les rats connaissent une croissance squelettique permanente naturelle en moyenne jusqu'à l'âge de 6 mois (179). La croissance longitudinale de la métaphyse proximale du tibia est ralentie au-delà pour atteindre $\sim 3\mu\text{m/j}$. La plaque de croissance du tibia proximal disparaît vers 15 mois (180). A ce jour, 6 mois d'âge est considéré comme une période adéquate pour étudier les variations structurales ostéo-médullaires en s'affranchissant de tout facteur confondant lié à la croissance ou à la sénescence.

La perte osseuse post-ménopausique, mimée chez le rongeur par gonadectomie, est associée à un taux de remodelage élevé (augmentation du nombre d'OB et d'OC) qui conduit à un déséquilibre de la balance ostéoformation/ostéorésorption. Chez l'Homme, la durée de vie des OB et des OC étant beaucoup plus courte (2 semaines à 3 mois) que la durée de vie des BMU (6 à 9 mois), l'apport constant de nouvelles cellules osseuses (OB et OC) est donc nécessaire au fonctionnement du cycle au sein des BMU. Or, l'augmentation du nombre d'OB recrutés dans ce contexte est insuffisante pour remplacer la matrice osseuse éliminée par l'action des OC favorisant ainsi la perte osseuse.

Une perte osseuse quantitativement variable selon le site squelettique a été rapportée après ovariectomie mais demeure controversée dans les maxillaires. En effet, dans la mandibule des rongeurs, la perte osseuse varie de 24 à 75% dans l'os alvéolaire selon le délai d'observation post-OVX et l'âge d'induction de l'Ovx (120,179). Les altérations microarchitecturales trabéculaires (diminution du volume osseux associée à une augmentation de la distance inter-travées) et corticales (diminution de l'épaisseur corticale) sont tardives et n'apparaissent pas avant 9 à 12

semaines post-ovariectomie (2-3 mois) chez le rat. Ces modifications sont observées le plus souvent chez des rattes jeunes ovariectomisées entre 2 et 6 mois. Plus le délai d'observation post-OVX est important, plus les altérations structurales de l'os alvéolaire sont marquées. Chez le rongeur, la perte osseuse alvéolaire a aussi été mesurée par le calcul de la différence de hauteur entre la jonction émail-cément (collet anatomique) et les bords marginaux osseux mésiaux des 3 molaires (174). De plus, Ames *et al.* ont décrit une moindre minéralisation de l'os alvéolaire 2 mois après OVX liée à une formation accrue d'os immature attribuée à l'accélération du remodelage osseux (181). Dans le tibia, l'ostéopénie est plus prononcée dans les 100 premiers jours post-OVX, reflétant une accélération précoce du remodelage osseux (182).

La relation entre la microarchitecture osseuse et le contenu adipeux médullaire a peu été étudiée. La quantification de l'adiposité médullaire chez les animaux (principalement la souris) a été initialement estimée en comptant les gouttelettes lipidiques présentes sur des coupes histologiques. Cependant, bien que considérée comme le gold standard, cette méthode est chronophage, « opérateur-dépendant » et ne reflète que partiellement les changements topographiques tridimensionnels. Plus récemment, la visualisation et la quantification du contenu adipeux médullaire ont été évaluées par une approche microCT couplée au marquage de l'adiposité médullaire par un agent de contraste (tetroxyde d'osmium) afin de mieux comprendre son développement au cours des maladies osseuses et de leurs traitements (183,184). En collaboration avec le laboratoire Prometheus d'ingénierie tissulaire squelettique de la Katholieke Universiteit de Leuven (Belgique), nous avons développé un protocole de visualisation 3D et d'analyse d'image permettant la mesure simultanée des paramètres de la microarchitecture osseuse, du contenu adipeux médullaire et de sa répartition au sein d'une même région d'intérêt (185,186). Les récents travaux rapportant un rôle paracrine de l'adiposité médullaire sur le métabolisme osseux, notamment par la sécrétion de RANKL par les adipocytes nous ont amenés à nous intéresser à la distribution de l'adiposité médullaire et à ses rapports à proximité de la surface osseuse trabéculaire (126).

Ce qu'il faut retenir :

Implication de l'adiposité médullaire dans la perte osseuse ?

- ✓ Les adipocytes médullaires sont des acteurs importants de la physiologie osseuse via la production de RANKL (stimulation de l'ostéoclastogenèse) et de PPAR γ (inhibition de l'ostéoblastogenèse).
- ✓ La composition en lipides des adipocytes médullaires (teneur en AG saturés) impacte la qualité osseuse.
- ✓ Influence du contenu adipeux médullaire et sa répartition au sein de la moelle sur la microarchitecture osseuse non connue à ce jour.

CHAPITRE 2 : OBJECTIFS

Dans le contexte d'un intérêt croissant à mieux comprendre les inter-relations entre le contenu adipeux médullaire et les différents niveaux d'organisation tissulaire osseux (en particulier à l'échelle de la microstructure), ce travail se propose d'étudier par microCT et en comparaison avec le tibia plus largement étudié, les variations des paramètres de microarchitecture osseuse et d'adiposité médullaire dans la mandibule dentée (os alvéolaire) et non dentée (condyle) au cours du vieillissement et dans le modèle de la ratte adulte ovariectomisée.

Ainsi, nous émettons l'hypothèse que les variations du contenu adipeux médullaire impactent les modifications microarchitecturales observées au cours du vieillissement et après ovariectomie.

Les objectifs de ce travail de thèse sont multiples :

1. Mettre au point un protocole fiable et reproductible permettant l'analyse quantitative et tridimensionnelle simultanée de la microarchitecture osseuse, du contenu adipeux médullaire et sa répartition topographique.
2. Etablir des valeurs de référence à baseline (6 mois) pour chaque localisation squelettique d'intérêt tant sur la microarchitecture que sur le contenu adipeux médullaire.
3. Evaluer les altérations microarchitecturales et d'adiposité médullaire observées au cours du vieillissement.
4. Evaluer les altérations microarchitecturales et d'adiposité médullaire observées après ovariectomie.

CHAPITRE 3 : MATERIELS ET METHODES

I. Protocole expérimental

69 ratte Sprague-Dawley âgées de 6 mois ont été utilisées dans cette étude. L'âge de 6 mois a été retenu pour s'affranchir des effets de la croissance (120,179). Les animaux, de poids homogène ($346g \pm 8.95g$) avant chirurgie, ont été opérés par le fournisseur (Janvier Lab, Laval, France) après répartition en 3 groupes distincts (Fig. 4):

- Groupe OVX_AL, groupe de ratte ovariectomisées (n=20), nourri *ad libitum*
- Groupe OVX-PF, groupe de ratte ovariectomisées (n=20), soumis jusqu'au terme du protocole à un rationnement alimentaire (pair-feeding) (187)
- Groupe SHAM, groupe de ratte opérées mais non ovariectomisées (n=29), nourri *ad libitum*.

Le protocole, référencé sous le n° suivant : APAFIS#4197-2015091514435707, a été approuvé par le comité national d'éthique en expérimentation animale n°075.

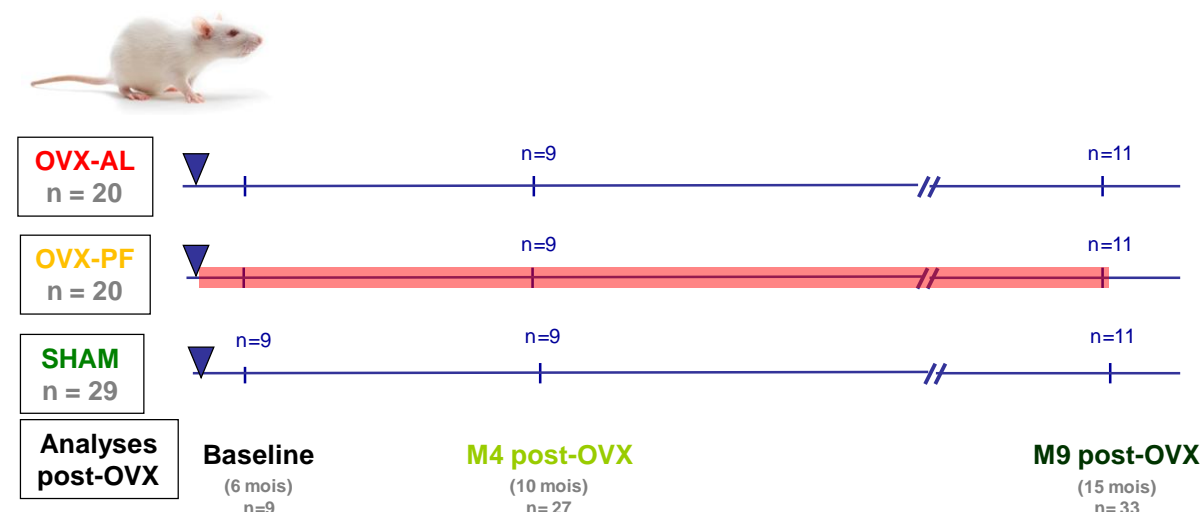


Figure 4 : Schéma du protocole expérimental : Suivi à court (M4 post-OVX) et long terme (M9 post-OVX) dans le modèle de la ratte adulte ovariectomisée à l'âge de 6 mois. OVX à 6 mois (triangle bleus). Pair-feeding maintenu jusqu'à la fin du protocole (rectangle rouge).

Les animaux, livrés 8 jours après la chirurgie, ont ensuite été placés durant toute la durée du protocole expérimental, en hébergement conventionnel à

l'animalerie du Département Hospitalo-Universitaire de Lille (Fig.5) dans un environnement contrôlé :

- cycles lumière/obscurité 7h/19h,
- température de la pièce maintenue constante entre 21-25°C,
- cages de type 4 (Lignocel[®]) avec présence d'élément d'enrichissement du milieu (tube cartonné),
- accès illimité en eau
- alimentation dure standard (SAFE A04, Augy, France).



Figure 5 : Hébergement conventionnel des animaux à l'animalerie du Département Hospitalier Universitaire en Ressources Expérimentales (DHURE, n° agrément animalerie : B5935010), Faculté de Médecine, Université de Lille.

Dans un souci de réduire leur stress, les animaux ont été placés selon les recommandations européennes à raison de 3 animaux par cage. Un suivi régulier des animaux a été mis en place selon les recommandations du guide du bien-être animal : observation quotidienne des signes de mauvaise intégration à leur environnement, de détresse ou de souffrance (troubles du comportement : prostration, hypo-motricité, perte du pelage, tremblements, automutilation, stéréotypie, difficultés à s'alimenter et/ou perte de poids...). Un suivi avec une pesée

quotidienne de la prise alimentaire des animaux et une pesée hebdomadaire des poids corporels des animaux a été effectué.

Afin de prendre en considération l'hyperphagie transitoire post-chirurgicale et de "normaliser" les sollicitations biomécaniques liées à la mastication entre le groupe SHAM et le groupe OVX, un protocole de rationnement alimentaire, également appelé « pair-feeding », a été mis en place sur l'ensemble de la période de protocole (40 semaines post-chirurgie, maintenu jusqu'aux sacrifices des animaux). Il a consisté à nourrir l'un des deux groupes ovariectomisés avec une quantité similaire à celle ingérée par le groupe SHAM (OVX-PF). L'autre groupe a été nourri de façon standard *ad libitum* (OVX-AL). 9 rattes de chaque groupe ont ainsi été sacrifiées 4 mois après la chirurgie (court-terme) et 11 rattes de chaque groupe ont été sacrifiées 9 mois après la chirurgie (long-terme). De plus, 9 rattes du groupe contrôle ont été sacrifiées 2 semaines après la chirurgie. Les animaux ont été sacrifiés par exsanguination (ponction cardiaque) sous anesthésie.

II. Préparation des échantillons

Au sacrifice, les os droits des animaux (hémi-mandibule et tibia) ont été prélevés, mesurés et immédiatement fixés dans la formaline neutre tamponnée (NBF) à 10% pendant 48h puis placés dans une solution phosphate tampon (PBS) avant analyses par microtomographie à rayons X (Fig. 6).

Les os gauches (hémi-mandibule et tibia) ont été fixés dans l'éthanol à 70% pendant 48h avant inclusion en résine polyméthylmétacrylate (PMMA) en vue d'une analyse de composition osseuse élémentaire (MEB) et moléculaire (microspectroscopie Raman).

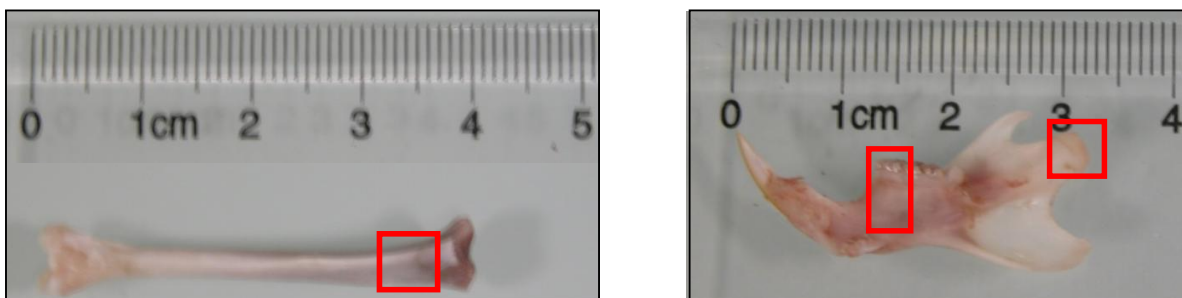


Figure 6 : Tibia et hémi-mandibule droits de ratte après fixation dans le NBF 10% - Encadré rouge (zones d'étude) : métaphyse proximale dans le tibia, os alvéolaire de la 1^{ère} molaire (zone dentée) et os trabéculaire du condyle (zone non dentée).

Une mesure de la longueur des os droits à baseline, M4 et M9 post-chirurgie, a été effectuée après fixation avec les repères anatomiques suivants pour évaluer la persistance ou non d'une croissance squelettique au cours du temps dans notre modèle :

- De l'épiphyse proximale à l'épiphyse distale pour le tibia
- De la pointe incisive jusqu'à l'angle goniale pour la mandibule

III. Acquisition et reconstruction d'image par microCT : SCAN1

L'évaluation de la microarchitecture, du contenu adipeux médullaire et de sa distribution a été réalisée dans les régions trabéculaires de trois sites squelettiques :

1. Dans la portion dentée mandibulaire au niveau de l'os alvéolaire intraradiculaire de la 1^{ère} molaire,
2. Dans la portion non dentée au niveau de la partie centrale du condyle mandibulaire,
3. Dans la spongieuse secondaire de la métaphyse proximale du tibia.

Les échantillons osseux ont été scannés une première fois (SCAN1) pour permettre l'analyse des paramètres de morphologie osseuse trabéculaire. Les hémimandibules et tibia ont été placés dans un tube porte-échantillon adapté et ont été scannés à l'aide de l'appareil de microtomographie à rayons X Skyscan 1172 ver.G (Bruker mCT, Kontich, Belgique). La suite logicielle du fabricant a été utilisée pour les étapes d'acquisition (Skyscan1172[®]), de reconstruction (NRecon[®]), de traitement et d'analyse (Dataviewer[®], CTAn[®]), et de visualisation (Dataviewer[®], CTVox[®]).

Les paramètres d'acquisition ont été déterminés afin d'optimiser la distinction des structures analysées, en concordance avec les indications du fabricant : une taille de pixel isotropique de 10 μ m², une tension d'accélération de 80 kVp, une intensité du courant de 100 μ A, un filtre physique Al-Cu pour réduire l'effet de durcissement de faisceau, un temps d'exposition 2400ms/cliché avec une moyenne de 3 clichés par rétro-projection, un pas de rotation de 0.5° pour une rotation de l'échantillon de 180°.

Les paramètres de reconstruction suivants ont été déterminés afin de distinguer le compartiment minéralisé osseux du compartiment non minéralisé correspondant à la moelle osseuse, en concordance avec les indications du fabricant : un alignement automatisé des rétro-projections, un filtre numérique Gaussien (valeur dans NRecon[®] : 2), un algorithme de réduction des artéfacts en anneaux (valeur RAR dans NRecon[®] : 6), un algorithme de correction de durcissement de faisceau (valeur BHC dans NRecon[®] : 50%), une plage dynamique de niveau de gris fixe adaptée à chaque site (os alvéolaire : 0-0.06 ; condyle : 0-0.04 ; tibia proximal : 0-0.04), un format d'image bitmap (.bmp) de 8 bits.

IV. Protocole de marquage de l'adiposité médullaire au tétr oxyde d'osmium

Nous avons réalisé des essais préliminaires comparant 5 protocoles de marquage des os d'intérêt chez le rat avec :

1. une solution de tétr oxyde d'osmium à 4% sans décalcification préalable,
2. une solution de tétr oxyde d'osmium à 2% sans décalcification préalable,
3. une solution de tétr oxyde d'osmium à 1% sans décalcification préalable,
4. une solution de tétr oxyde d'osmium à 1% après décalcification à l'EDTA pendant 21 jours,
5. une solution de tétr oxyde d'osmium à 1% après décalcification avec une solution d'acide formique/NBF 10% (ratio 1 :1) pendant 4 jours.

L'étape de décalcification est nécessaire à l'obtention d'un marquage intégral de l'adiposité médullaire. Le protocole de marquage de l'adiposité médullaire n°5, fiable, reproductible et rapide a été retenu.

Les échantillons ont été décalcifiés sous oscillations contrôlées de faible amplitude à une température contrôlée (+4°C) pendant 4 jours dans une solution d'acide formique à 4% et de NBF à 10% (rapport 1 :1) puis rincés à l'eau distillée. Chaque échantillon osseux décalcifié a été marqué sous sorbonne à température ambiante dans une solution de tétr oxyde d'osmium concentrée à 1% stabilisée par une solution de dichromate de potassium à 2.5%, pendant 48h.

Les échantillons marqués (Fig.7) ont été rincés dans un bain de solution saline tamponnée au phosphate (PBS) pendant 3h et répété sur une période de 12h à

température ambiante puis stockés à +4°C dans une solution de PBS avant nouvelle acquisition microCT.



Figure 7 : Coloration noire prise par les os d'intérêt (tibia/mandibule) après décalcification et marquage au tétr oxyde d'osmium.

V. Acquisition et reconstruction d'image par microCT : SCAN2

Pour analyser le tissu adipeux médullaire marqué à l'osmium, les échantillons ont été scannés une seconde fois (SCAN 2) avec les mêmes paramètres d'acquisition.

Les paramètres de reconstruction suivants ont été déterminés afin de révéler le contenu adipeux marqué à l'osmium, en concordance avec les indications du fabricant : un alignement automatisé des rétro-projections, un filtre numérique Gaussien (valeur dans NRecon[®] : 2), un algorithme de réduction des artefacts en anneaux (valeur RAR dans NRecon[®] : 3), un algorithme de correction de durcissement de faisceau (valeur BHC dans NRecon[®] : 30%), une plage dynamique de niveau de gris fixe adaptée à chaque site (os alvéolaire : 0-0.07 ; condyle : 0-0.095 ; tibia proximal : 0-0.095), un format d'image bitmap (.bmp) de 8 bits.

VI. Alignement des jeux de données d'image : superposition SCAN 1 et SCAN 2

En fonction du site étudié, les cross-sections issues de la reconstruction ont été orientées dans les trois plans de l'espace selon l'axe longitudinal de la métaphyse proximal dans le tibia et le grand axe de la 1^{ère} molaire du secteur denté alvéolaire et du condyle (portion non dentée) dans la mandibule.

Les jeux de données orientés (SCAN1 et SCAN2) ont été superposés manuellement en suivant ces étapes (Fig.8) :

1. superposition des contours externes (partie corticale) des objets scannés,
2. ajustement des structures les plus minéralisées (ex : émail de l'incisive),
3. à l'aide de plusieurs points de vue dans les trois plans de l'espace, ajustement du réseau trabéculaire et des espaces médullaires à l'aide des profils représentant les variations de densité.

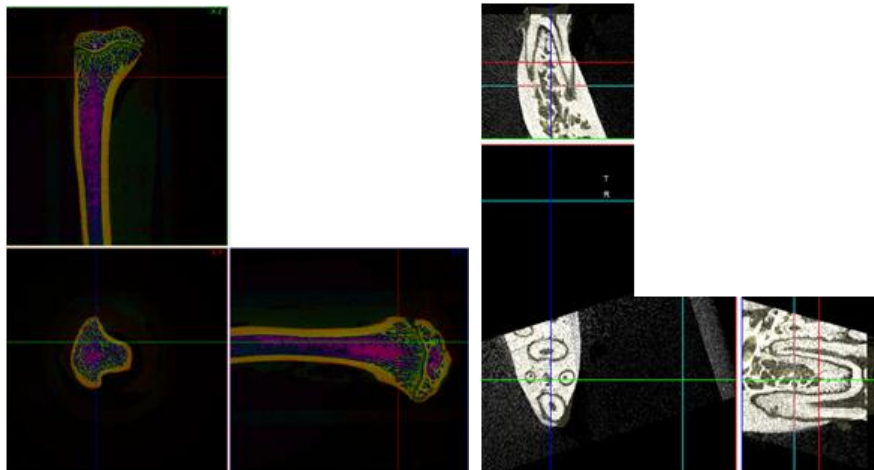


Figure 8 : Superposition des jeux de données avant/après marquage (SCAN1/SCAN2) dans les trois plans de l'espace : tibia (à gauche) et os alvéolaire (à droite).

VII. Détermination des Volumes et Régions d'Intérêt (VOI-ROI)

Une fois les SCAN1 et SCAN2 superposés, les volumes d'intérêt (VOI) ont été définis dans les trois sites (Fig. 9):

- Dans le tibia, le VOI correspond à 200 cross-sections (2mm) située 150 cross-sections (1.5mm) sous la plaque de croissance (188).
- Dans l'os alvéolaire, le VOI correspond à l'ensemble de la hauteur radiculaire, du plancher à l'apex des racines de la 1^{ère} molaire (représentant en moyenne 300 cross-sections).
- Dans le condyle, le VOI correspond à la région centrale condylienne, 50 cross-sections (0.5mm) située 0.5mm au dessous du dôme condylien (sous la portion osseuse sous-chondrale).

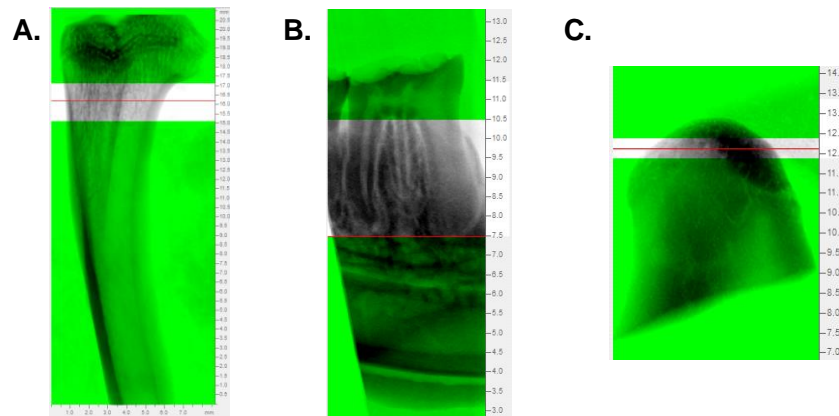


Figure 9 : Détermination du Volume d'intérêt (VOI) dans les 3 sites analysés : métaphyse proximale du tibia (A), os alvéolaire de la 1^{ère} molaire (B), zone centrale du condyle mandibulaire (C). En vert, cross-sections exclues du VOI.

Les régions d'intérêts (ROI) ont été déterminées au sein de chaque VOI par un algorithme semi-automatique dans le tibia et par placement d'une forme géométrique dans l'os alvéolaire et le condyle (Fig. 10) :

- Dans le tibia, La distinction des compartiments trabéculaires et corticaux a été définie de manière semi-automatique également selon le protocole décrit par le fabricant (189).
- Dans l'os alvéolaire, la ROI a été définie par une adaptation du protocole décrit par Du *et al.* (ellipses à la place de cercles) (190).
- Dans le condyle, la ROI a été définie dans la région centrale par des rectangles de 1mm de longueur et 0.5mm de largeur selon le protocole décrit par Jiao *et al.*(191).

Bresin *et al.* ont suggéré que l'incisive à croissance continue chez le rat, qui occupe une grande partie du corps mandibulaire, pourrait également jouer un rôle dans la microarchitecture de l'os alvéolaire des molaires (36). Pour limiter cet impact dans la présente étude, la ROI dans laquelle la microarchitecture osseuse a été analysée, a été choisie à distance de l'incisive (os inter-radiculaire de la 1^{ère} molaire jusqu'à l'apex des racines dentaires).

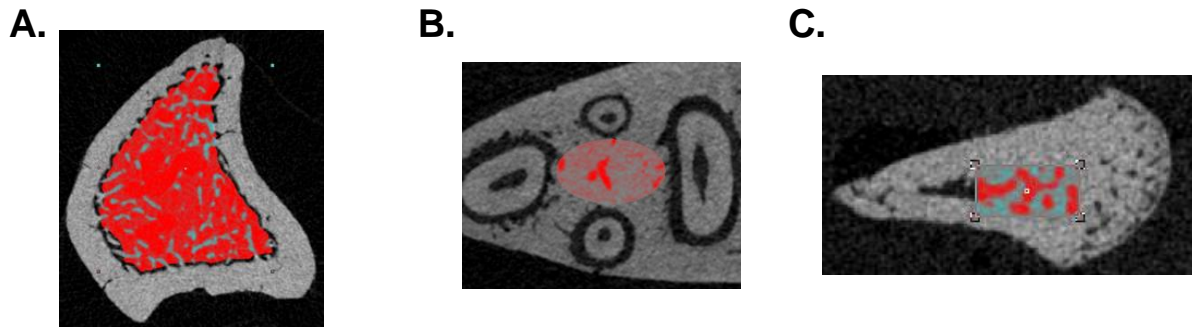


Figure 10 : Détermination de la ROI trabéculaire dans les 3 sites analysés : méthode semi-automatique dans le tibia (A), formes géométriques dans la mandibule : ellipse au niveau de l'os alvéolaire de la 1^{ère} molaire (B) et rectangle au niveau du condyle (C).

VIII. Paramètres de microarchitecture osseuse trabéculaire

La méthode de segmentation semi-automatique d'Ostu a été retenue pour définir les valeurs de seuillage discriminant le compartiment minéralisé osseux du compartiment médullaire au sein des ROI (192). Les paramètres de microarchitecture osseuse suivants ont été mesurés :

1. Rapport volume osseux sur le volume tissulaire (BV/TV, %)
2. Rapport volume de moelle sur le volume tissulaire (Ma.V/TV, %)
3. Rapport surface osseuse sur le volume tissulaire (BS/TV, %)
4. Densité trabéculaire (Tb.N, mm^{-1})
5. Epaisseur des travées (Tb.Th, mm)
6. Espacement des travées (Tb.Sp, mm)
7. Indice de fragmentation du réseau trabéculaire (Tb.Pf, mm^{-1}) (Fig. 11-12)

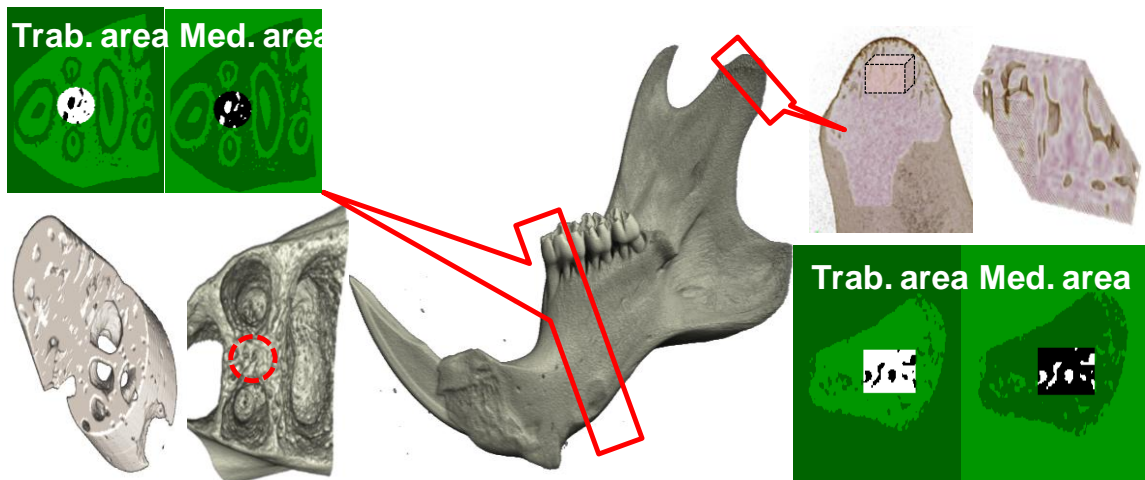


Figure 11 : Méthode de seuillage dans la mandibule : le compartiment osseux trabéculaire (Trab. area) obtenu par méthode d'Otsu au sein de la ROI de l'os alvéolaire (à gauche) et du condyle (à droite) et le compartiment médullaire (Med. area) obtenu par seuillage inverse.

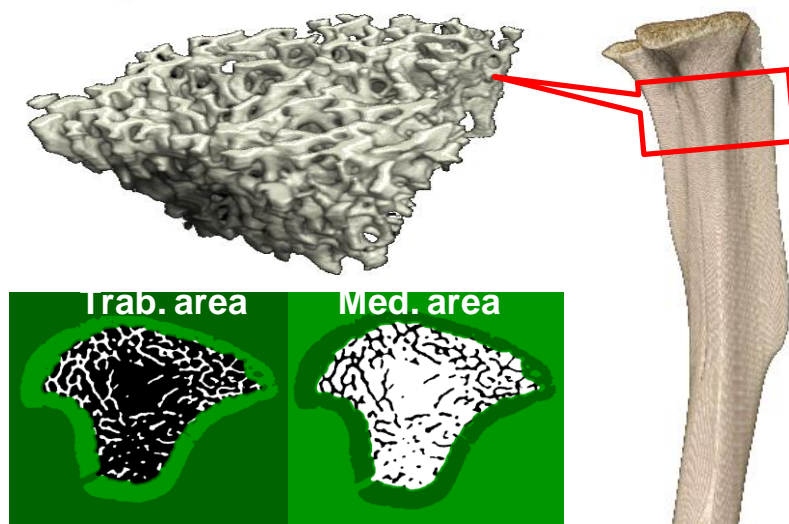


Figure 12 : Méthode de seuillage dans le tibia : le compartiment osseux trabéculaire (Trab. area) obtenu par méthode d'Otsu au sein de la ROI dans le tibia et le compartiment médullaire (Med. area) obtenu par seuillage inverse.

IX. Contenu et distribution de l'adiposité médullaire

L'analyse du contenu adipeux médullaire a été effectuée au sein de la ROI utilisée pour l'analyse de la microarchitecture osseuse trabéculaire.

La méthode de segmentation retenue pour définir les valeurs de seuillage discriminant le contenu adipeux médullaire marqué à l'osmium au sein des ROI de chaque site est la suivante :

- Dans les sites mandibulaires, une borne fixe de valeurs de seuillage (110-255 niveaux de gris) a été retenue.
- Dans la métaphyse proximale du tibia, un seuillage semi-automatique d'Otsu à multiples niveaux (3 niveaux) a été appliqué.

Les paramètres d'adiposité médullaire suivants ont été mesurés :

1. Rapport volume d'adiposité médullaire sur le volume tissulaire ($Ad.V/TV$, %)
 2. Rapport volume d'adiposité médullaire sur le volume médullaire ($Ad.V/Ma.V$, %).
- Il s'agit d'un nouveau paramètre que nous avons publié.

La distribution spatiale de l'adiposité médullaire a été étudiée par dilatation successive du volume osseux initial d'un pas de $20\mu\text{m}$ (correspondant au diamètre moyen d'un adipocyte médullaire) constituant des bandes d'analyse au sein de la moelle osseuse. Un algorithme semi-automatique a été utilisé permettant d'exprimer le pourcentage d'adiposité médullaire au sein de ces bandes. Cet algorithme est constitué des opérations de traitement d'image suivantes :

1. seuillage semi-automatique d'Otsu pour segmenter l'os trabéculaire,
2. dilatation en 3D du volume trabéculaire de 2 pixels ($20\mu\text{m}$),
3. analyse 3D pour déterminer le rapport d'adiposité médullaire contenue dans chaque volume trabéculaire dilaté obtenu.

X. Traitements statistiques

Les analyses ont été réalisées avec le logiciel SAS package[®], release 9.4 (SAS Institute, Cary, NC). Les variables continues ont été décrites par la moyenne et la déviation standard, ou par la médiane et l'intervalle interquartile. La normalité des distributions a été vérifiée graphiquement et par le test de Shapiro-Wilk.

La prise alimentaire a été comparée entre les groupes, semaine par semaine, par un modèle linéaire mixte avec un effet aléatoire sur le rat, afin de tenir compte de la corrélation entre les mesures répétées d'un même sujet.

Le poids corporels des animaux a été comparé entre les groupes, semaine par semaine, par un modèle linéaire mixte avec un effet aléatoire sur le rat, afin de tenir compte de la corrélation entre les mesures répétées d'un même sujet. De plus, la comparaison du poids corporel des animaux avant chirurgie, ainsi que le delta relatif entre pré-chirurgie et 4 et 9 mois post-chirurgie entre les 3 groupes (SHAM, OVX_AL, OVX_PF), a été réalisée par un modèle d'analyse de la variance (ANOVA) ou un test de Kruskal-Wallis. En cas de résultats significatifs, des tests post-hoc ont été effectués.

Les longueurs d'os ont été comparées entre les groupes et entre les temps par un modèle d'analyse de la variance avec un terme d'interaction groupes*temps. La relation entre la longueur du tibia et celle de la mandibule a été évaluée par un coefficient de corrélation de Pearson.

Les paramètres de microarchitecture osseuse et d'adiposité médullaire ont été comparés entre les 3 localisations squelettiques (métaphyse proximale du tibia, os alvéolaire et condyle) et les 3 temps (baseline, M4, M9) dans le groupe SHAM par un modèle linéaire mixte avec un effet aléatoire sur le rat. Des comparaisons post-hoc entre les localisations squelettiques ont aussi été réalisées.

Les paramètres de microarchitecture osseuse et d'adiposité médullaire ont été comparés entre les 3 groupes (SHAM, OVX_AL, OVX_PF) au sein de chaque

localisation squelettique et à M4 et M9 grâce à un modèle linéaire mixte avec un effet aléatoire sur le rat. Des comparaisons post-hoc entre les localisations squelettiques ont été réalisées.

La relation entre la microarchitecture osseuse trabéculaire et le contenu adipeux médullaire (distribution spatiale) a été évaluée par un modèle d'analyse de la variance, par localisation (métaphyse proximale du tibia et os alvéolaire) et par temps (M4 et M9).

La relation entre les variables de microarchitecture osseuse et les variables d'adiposité médullaire a été évaluée par un coefficient de corrélation des rangs de Spearman au sein de chaque localisation.

La signification statistique pour l'ensemble des tests a été fixée à $p < 0,05$.

XI. Analyse statistique multivariée

Une analyse statistique multivariée a été réalisée à partir des données microCT de microarchitecture osseuse et d'adiposité médullaire obtenues. Les données microCT ont été traitées par l'analyse statistique multivariée dite Analyse en Composantes Principales (ACP) (193).

L'ACP est une méthode qui permet d'explorer la variabilité au sein d'un jeu de données. Cette analyse est qualifiée de « non supervisée ». Le jeu de données est analysé sans aucun a priori ou contrainte(s). Cette analyse est un outil de choix permettant d'étudier les relations entre les variables (BV/TV, Ad.V/Ma.V etc...) et les échantillons des groupes (SHAM, OVX) aux différents temps post-chirurgie (baseline, M4, M9). Pour cela, l'algorithme va séparer le jeu de données en Composantes Principales (PC, Principal Components). Une PC correspond à la combinaison linéaire des variables du jeu de données. Chaque PC décrit une partie de la variabilité. La première PC (PC1) correspond à la combinaison de variables qui décrivent la plus grande variabilité ; PC2 correspond à la combinaison de variables qui décrivent la 2^{ème} source de variabilité ; etc.

L'analyse PCA a été réalisée avec la fonction PLS Toolbox v 6.7 (Eigenvector Research Inc., West Eaglerock Drive, Wenatchee, WA, 98801) fonctionnant dans l'environnement Matlab R2010a (Mathworks Inc., Natick, MA, USA). Avant l'ACP, la fonction Autoscale a été appliquée sur le jeu de données afin de normaliser les variables d'ordre de grandeur différentes et de maximiser la précision de l'analyse.

CHAPITRE 4 : RESULTATS

I. Suivi de la prise alimentaire

La prise alimentaire est augmentée de l'ordre de 10 à 20% dans le groupe OVX_AL par rapport aux groupes SHAM et OVX_PF jusqu'à la 8^{ème} semaine. Au-delà de la 8^{ème} semaine, la quantité ingérée dans le groupe OVX_AL est similaire à celle du groupe SHAM jusqu'à la fin du protocole. De plus, à partir de la 11^{ème} semaine et jusqu'à la fin du protocole, on observe une diminution de la quantité ingérée de l'ordre de 15% dans le groupe OVX_PF par rapport aux groupes SHAM et OVX_AL. La figure 13 illustre cette hyperphagie transitoire dans le groupe OVX_AL jusqu'à 8 semaines après ovariectomie ainsi que l'hypophagie constatée dans le groupe OVX_PF à partir de la 11^{ème} semaine (Fig. 14).

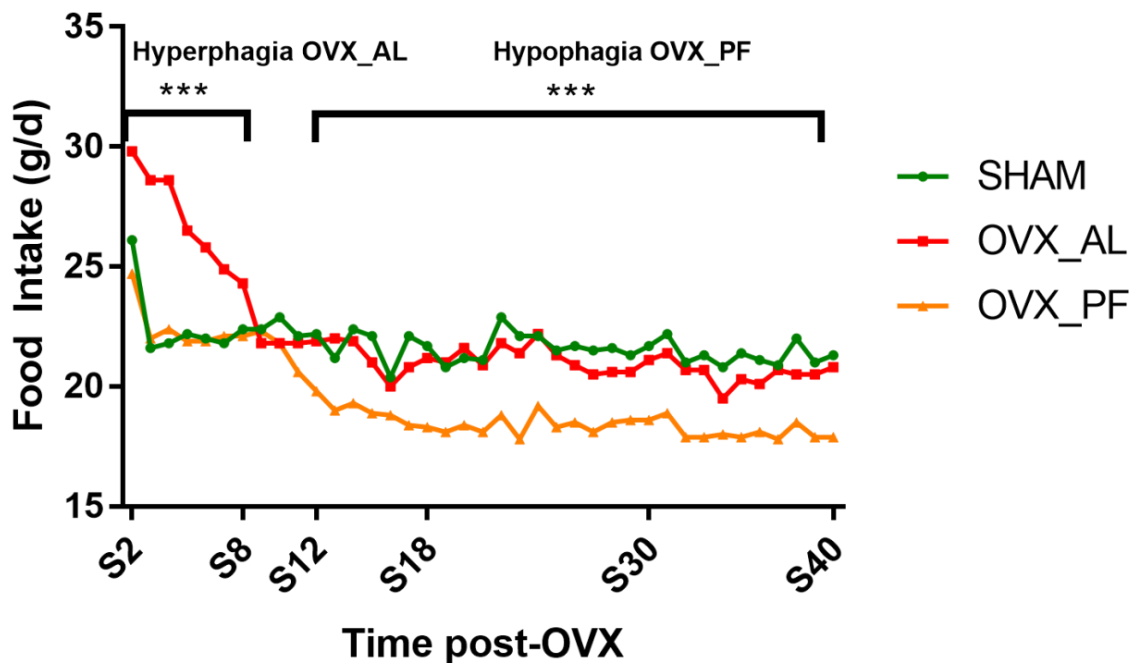


Figure 13 : Suivi de la prise alimentaire moyenne (exprimée en g/j) semaine par semaine dans chaque groupe. *** $p < 0.0001$.

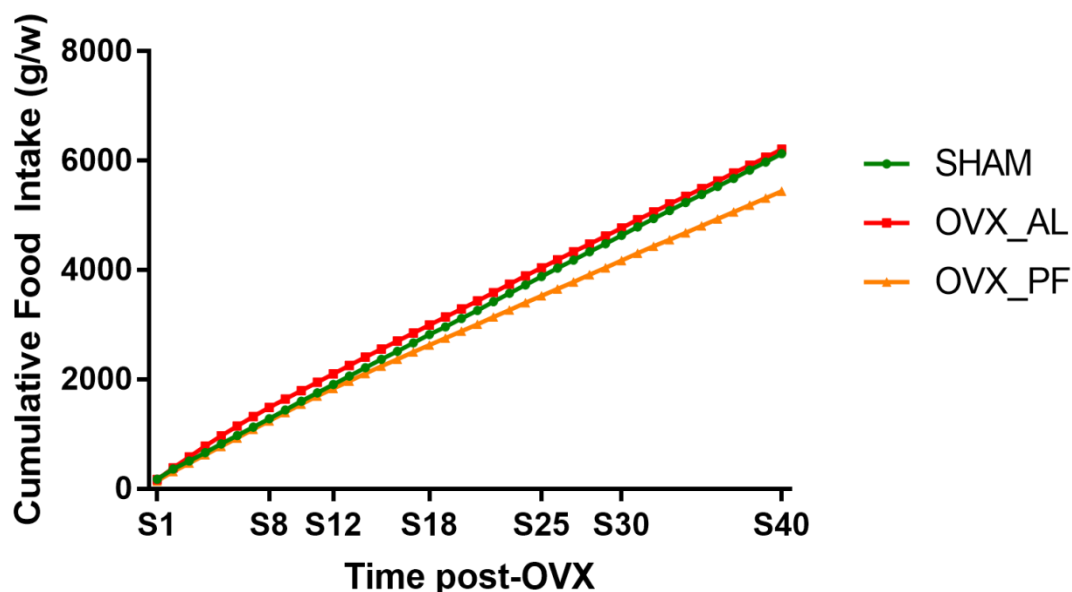


Figure 14 : Apport alimentaire hebdomadaire cumulé sur l'ensemble de la période de suivi.

II. Suivi du poids corporel des animaux

Le poids moyen des animaux avant chirurgie était de $346g \pm 8.95g$ (Fig 15). Dès la 2^{ème} semaine post-ovariectomie (W2), une différence de poids d'environ 10% est constatée entre les animaux du groupe OVX_AL et ceux du groupe SHAM (404g vs 364g, $p < 0.05$), mettant en évidence une prise de poids rapide après ovariectomie suivie d'une prise de poids plus lente après l'hyperphagie observée de la semaine 8 à la semaine 40. Cette différence de poids est retrouvée également entre les animaux du groupe OVX_PF et ceux du groupe SHAM à W2 (+6%, $p < 0.001$), témoignant d'une prise de poids malgré le rationnement alimentaire. Il est probable que le maintien de la différence de poids au-delà de la période d'hyperphagie transitoire entre les animaux des groupes OVX_AL/OVX_PF et ceux du groupe SHAM soit lié à des mécanismes complexes : réduction des dépenses énergétiques, capacité métabolique amoindrie après ovariectomie (194).

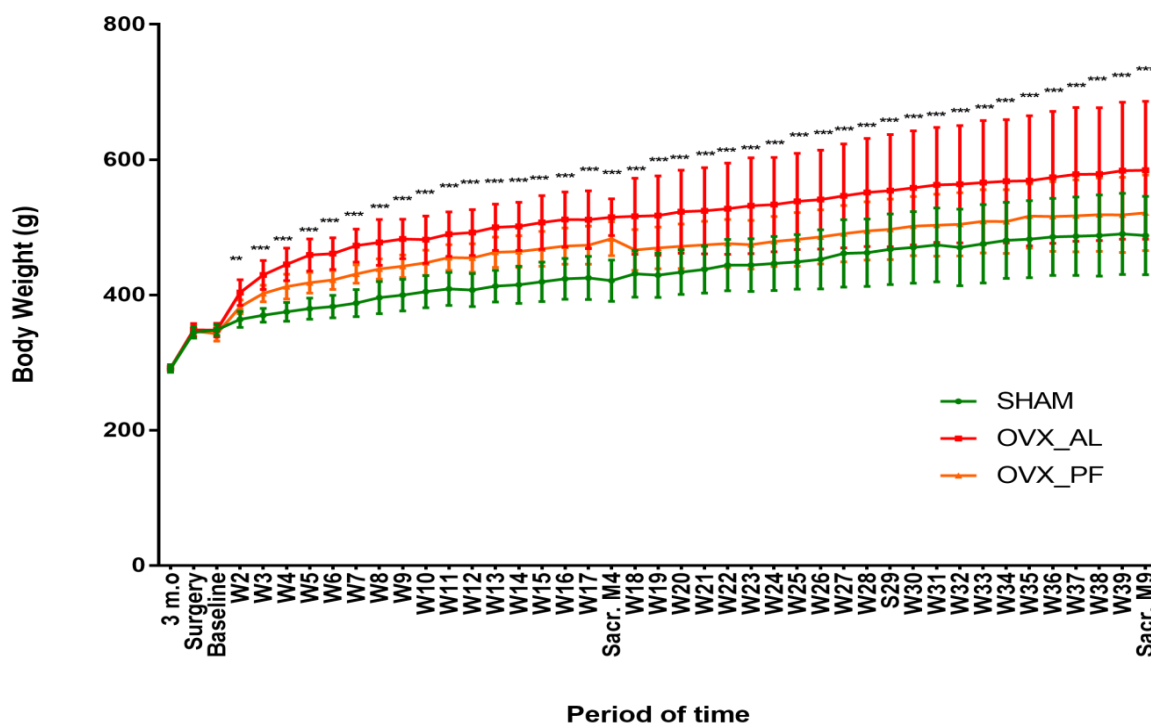


Figure 15 : Courbe de suivi du poids corporel des animaux (en g) sur l'ensemble de la période de protocole, ** p<0.01, *** p<0.0001.

La comparaison du delta de poids corporel des animaux avant-chirurgie/M4 et avant-chirurgie/M9 montre une prise de poids au sein de l'ensemble des groupes (Fig.16) :

- Dans le groupe SHAM, on note une augmentation de poids de 22,97% à M4 et de 42,45% à M9.
- Dans le groupe OVX_PF, on note une augmentation de poids de 41,08% à M4 et de 52,25% à M9.
- Dans le groupe OVX_AL, on note une augmentation de poids de 50,42% à M4 et de 70.62% à M9.

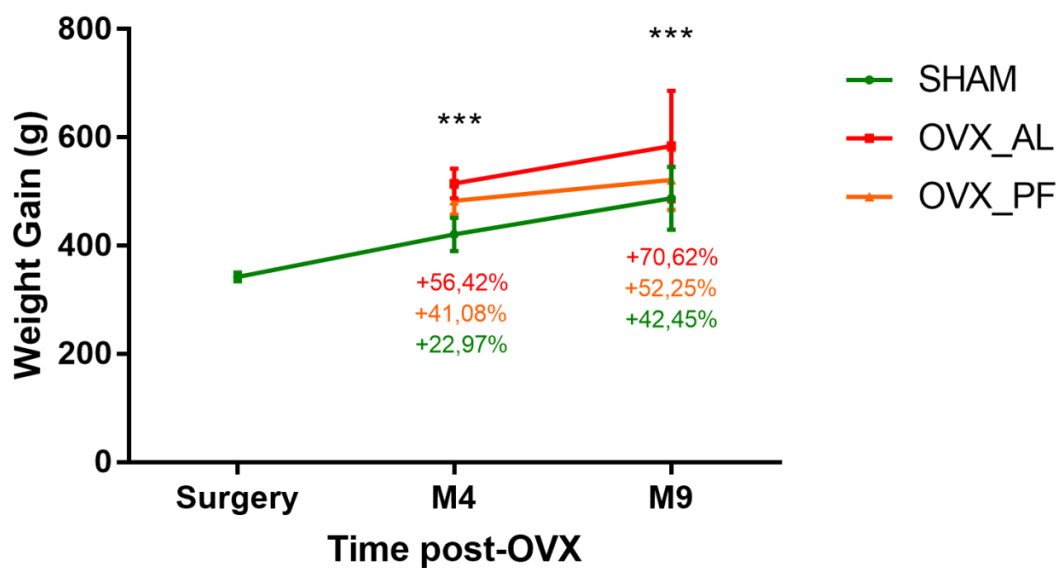


Figure 16 : Comparaison des prises de poids corporel (weight gain, exprimées en g) respectives à M4 et M9 avec pour référence le poids avant chirurgie dans les groupes SHAM, OVX_AL et OVX_PF. Les pourcentages indiquent le niveau de variation respectif au sein de chaque groupe par rapport aux poids avant chirurgie (surgery). Le niveau de significativité P des deltas de poids inter-groupes est mentionné à court (M4) et long (M9) terme par *** $p < 0.0001$

III. Suivi de la croissance osseuse

A M4 comme à M9, la comparaison de la longueur osseuse des tibias d'une part et des mandibules d'autre part entre les groupes SHAM, OVX_AL et OVX_PF ne montre aucune différence. En revanche, une augmentation de la longueur osseuse statistiquement significative d'environ +1 mm ($p < 0.0001$) des tibias comme des mandibules a été constatée entre baseline (groupe SHAM) et M4 comme M9 (quelque soit le groupe). Aucune différence significative de la longueur osseuse du tibia comme de la mandibule n'a pu être mise en évidence entre M4 et M9 (Fig. 17).

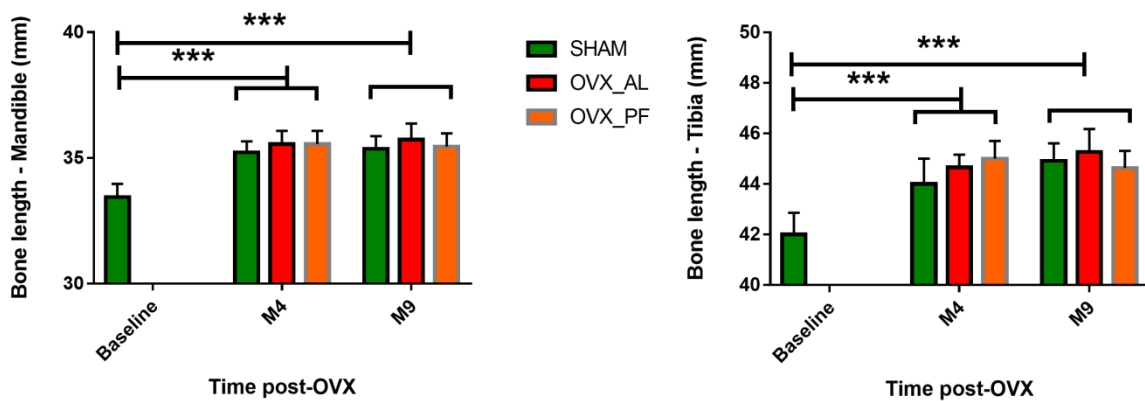


Figure 17 : Suivi de la croissance en longueur des os dans les 3 groupes en fonction du temps après chirurgie *** $p < 0.0001$

IV. Etablissement de données de références à baseline

1. Microarchitecture osseuse trabéculaire

Trois sites squelettiques ont été étudiés, respectivement l'os alvéolaire et le condyle dans la mandibule ainsi que la métaphyse proximale dans le tibia.

Le volume osseux trabéculaire (BV/TV) était significativement supérieur dans l'os alvéolaire et le condyle respectivement de +48,3% et de +58,2% comparativement à la métaphyse proximale du tibia ($p < 0.0001$). Le volume osseux médullaire (Ma.V/TV) était significativement inférieur dans l'os alvéolaire et le condyle respectivement de -78% et de -185% comparativement à la métaphyse proximale du tibia ($p < 0.0001$). La densité trabéculaire (Tb.N) était significativement supérieure dans l'os alvéolaire le condyle respectivement de +20.9% et de +24.1% de même que l'épaisseur des travées (Tb.Th) respectivement de +38,5% et de +46,7% en comparaison au site tibial ($p < 0.0001$). La distance moyenne séparant les travées (Tb.sp) était similaire dans l'os alvéolaire et la métaphyse proximale du tibia, mais était significativement inférieure, de l'ordre de -80% dans le condyle par rapport aux deux autres sites analysés ($p < 0.0001$). Les valeurs d'indice de fragmentation trabéculaire (Tb.Pf) étaient négatives dans les sites mandibulaires et positives dans le tibia (Fig. 18).

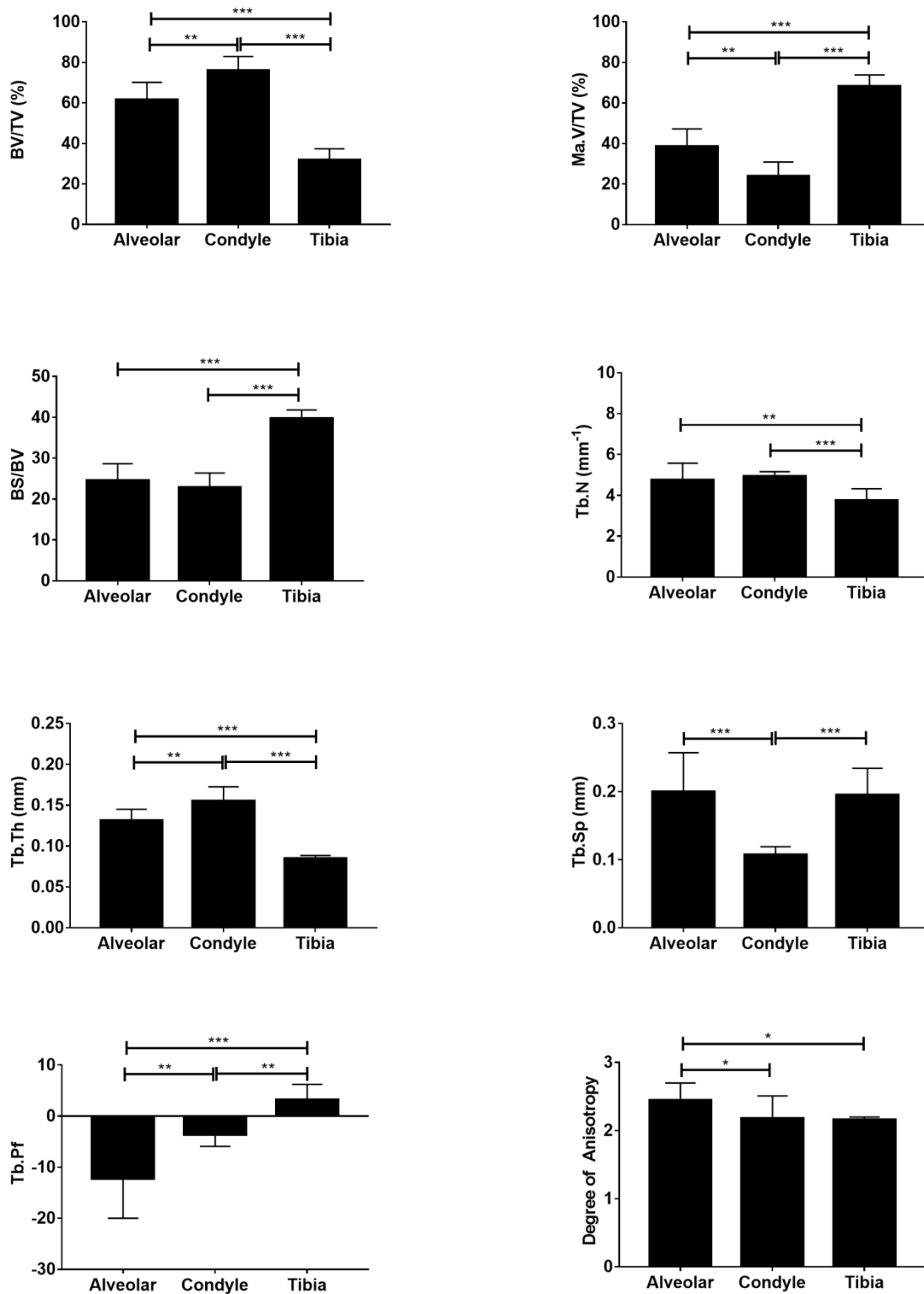


Figure 18 : Paramètres de microarchitecture osseuse illustrant les spécificités de site à baseline. BV/TV (%) : Rapport au volume osseux, Ma.V/TV (%) : Rapport au volume médullaire, BS/BV : Ratio surface osseuse trabéculaire/volume osseux trabéculaire, Tb.N (mm⁻¹): Densité trabéculaire, Tb.Th (mm) : Trabecular Thickness, Tb.Sp (mm) : Trabecular Separation, Tb.Pf : Trabecular Pattern Factor, DA : Degree of Anisotropy, *p<0.05, **p<0.01, *** p<0.0001

2. Contenu adipeux médullaire

Le contenu adipeux médullaire a été caractérisé par deux paramètres : le ratio volume d'adiposité médullaire/volume tissulaire (Ad.V/TV, %) et le ratio volume d'adiposité médullaire/volume médullaire (Ad.V/Ma.V, %). Le volume de moelle (Ma.V/TV, %) était significativement inférieur dans l'os alvéolaire et le condyle respectivement de -77.5% et de -185%, comparativement à la métaphyse proximale du tibia ($p < 0.0001$). Aucun contenu adipeux médullaire n'a été observé dans le condyle chez les rattes de 6 mois. Dans le tibia, un contenu adipeux médullaire supérieur à l'os alvéolaire a été observé (9% vs 1.5%, $p = 0.0002$), (Fig. 19-20).

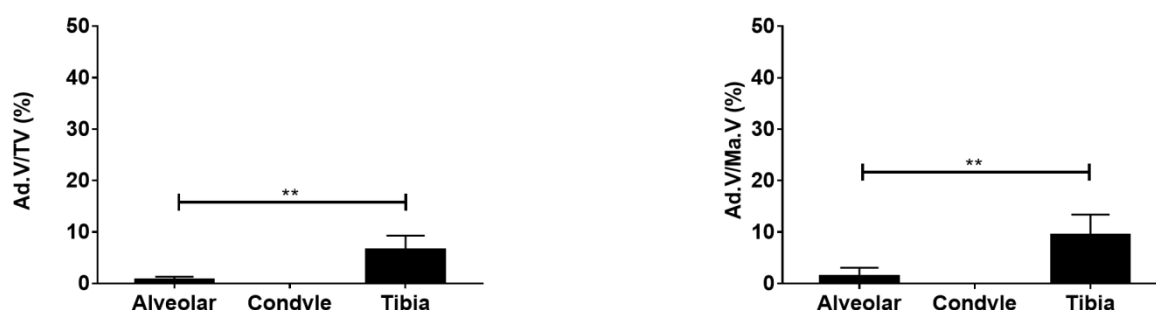


Figure 19 : Paramètres d'adiposité médullaire à baseline dans les 3 sites analysés. Ad.V/TV (%) : Rapport au volume adipocytaire, Ad.V/Ma.V : Ratio volume adipeux/volume de moelle disponible. ** $p < 0.01$

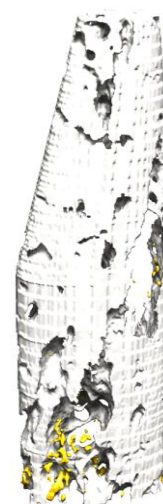
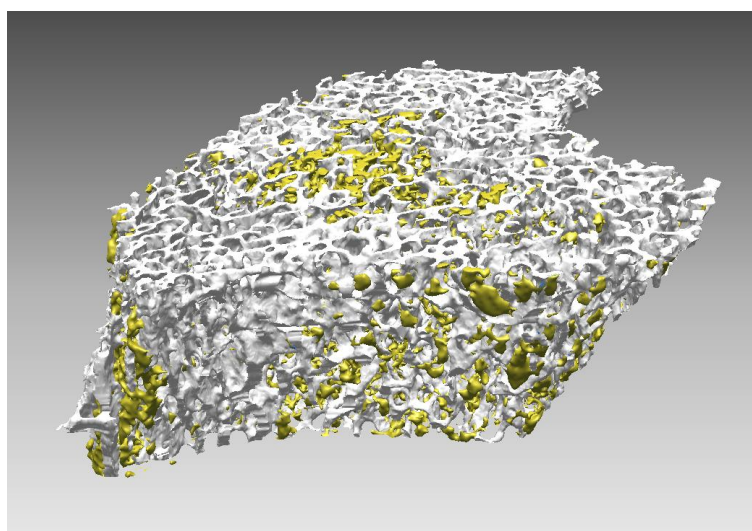


Figure 20 : Illustration 3D de la microarchitecture osseuse et de l'adiposité médullaire dans le tibia et l'os alvéolaire de la 1^{ère} molaire dans la mandibule (zone dentée) dans le groupe SHAM à baseline

Une corrélation négative a été retrouvée dans le tibia entre les paramètres Ad.V/TV et Tb.Th (Fig. 21). Pour les 2 autres sites squelettiques, aucune corrélation n'a pu être mise en évidence entre les paramètres microarchitecturaux et les paramètres d'adiposité médullaire à baseline.

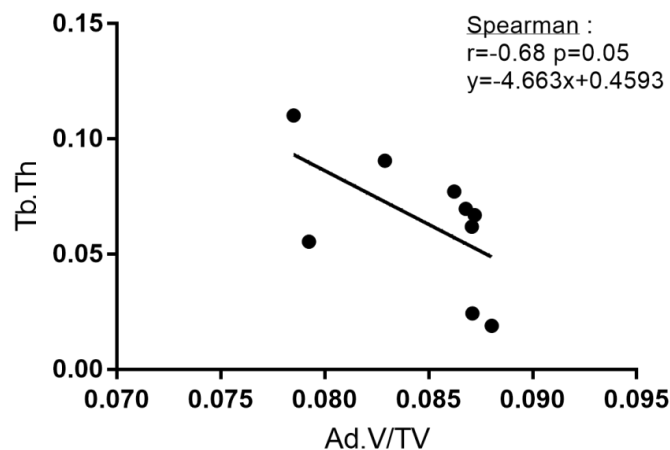


Figure 21 : Droites de régression linéaire obtenues entre les paramètres Tb.Th et Ad.V/TV dans le tibia (groupe SHAM) à baseline. Test non paramétrique de Spearman. Le coefficient de corrélation (r), l'équation de la droite et le niveau de significativité p sont indiqués.

3. Relation spatiale entre surface osseuse trabéculaire et adiposité médullaire

La comparaison des répartitions spatiales d'adiposité médullaire entre tibia et os alvéolaire, représentée ci-dessous sous forme d'histogrammes (Fig. 22, B), montre des différences de sites. En effet, dans l'os alvéolaire et le tibia, 50% du volume adipocytaire était situé à une distance moyenne de 40 μ m de la surface osseuse trabéculaire (Fig. 22 A). Dans la métaphyse proximale du tibia, la concentration maximale adipocytaire (~25% de l'adiposité totale) était localisée en contact avec la surface osseuse trabéculaire (0-20 μ m), tandis que dans l'os alvéolaire, cette concentration maximale adipeuse (~30% de l'adiposité totale) était située plus à distance (entre 20 et 60 μ m).

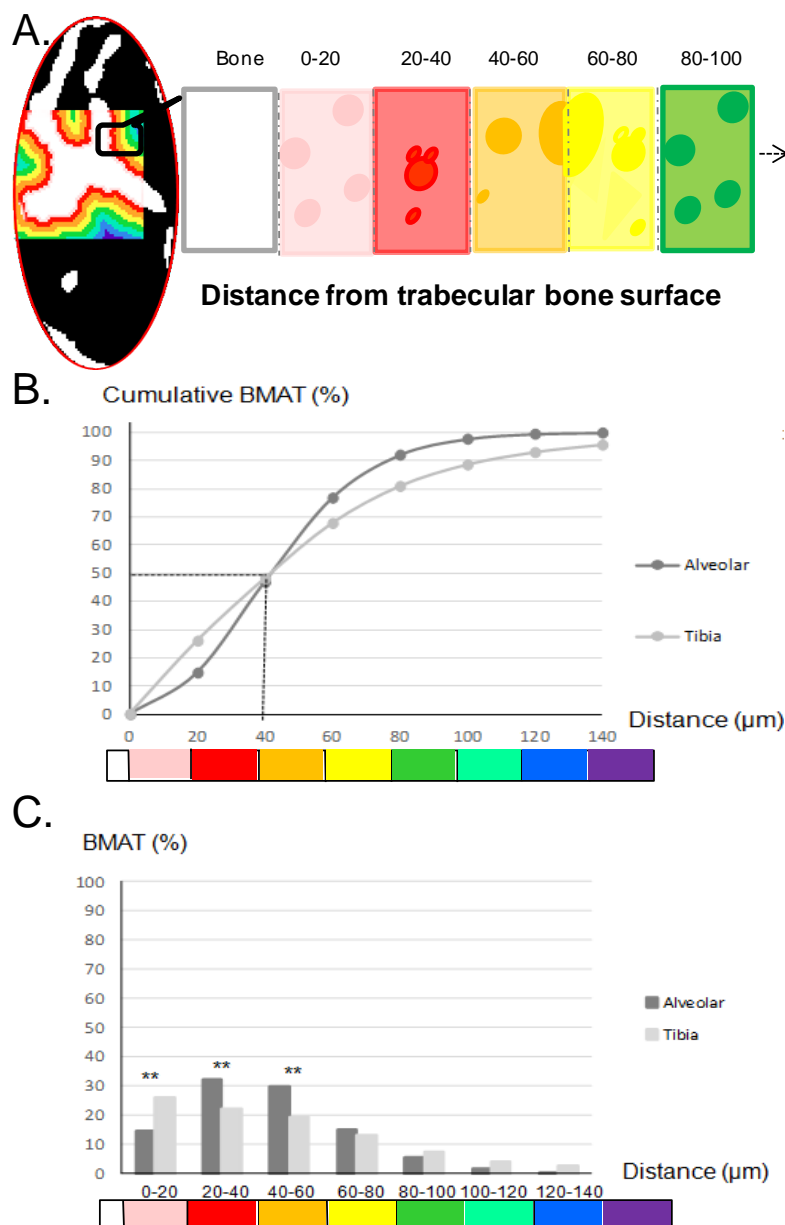


Figure 22 : Profil de distribution de l'adiposité médullaire (BMAT) et relation avec la surface osseuse trabéculaire.

- A. Cross-section 2D dans la ROI alvéolaire illustrant l'os trabéculaire (en blanc), la moelle osseuse (en noir) et les bandes de moelle osseuse (en couleur) de 20µm d'épaisseur depuis la surface osseuse trabéculaire au sein desquelles l'adiposité médullaire a été mesurée.
- B. % d'adiposité médullaire cumulée dans l'os alvéolaire et le tibia à baseline
- C. Histogrammes illustrant la répartition spatiale de l'adiposité médullaire.

V. Vieillessement

1. Microarchitecture osseuse trabéculaire

Dans le groupe SHAM, les comparaisons des paramètres de microarchitecture osseuse mesurés dans chaque site (tibia, os alvéolaire, condyle) entre les 3 temps d'observation (baseline, M4 et M9) ne présentent aucune différence significative liée au vieillissement. En revanche, les comparaisons des paramètres de microarchitecture osseuse entre les différents sites osseux mettent en évidence des différences significatives équivalentes à celles décrites précédemment à baseline au sein du groupe SHAM aux temps d'observation M4 et M9 (Fig. 23).

2. Contenu adipeux médullaire

Dans le groupe SHAM, la comparaison des paramètres Ad.V/TV et Ad.V/Ma.V mesurés dans chaque site (tibia, os alvéolaire, condyle) entre les 3 temps d'observation (baseline, M4 et M9) montre des différences significatives uniquement dans le tibia (Fig. 24).

Dans le tibia, on constate en effet une augmentation significative des 2 paramètres à M4 d'un facteur supérieur à 2 par rapport à baseline puis une diminution significative de -30% ($p < 0.0001$) à M9 par rapport à M4. Néanmoins, on observe une variabilité inter-individuelle (écart-types) marquée de ces 2 paramètres à M4 comme à M9.

Dans la mandibule, aucun contenu adipeux médullaire n'a été retrouvé dans le condyle, quel que soit l'âge des animaux du groupe SHAM. Comparativement au tibia, l'os alvéolaire possède un contenu adipeux médullaire environ 40 fois inférieur à M4 ($p < 0.0001$) et environ 15 fois inférieur à M9 ($p < 0.0001$).

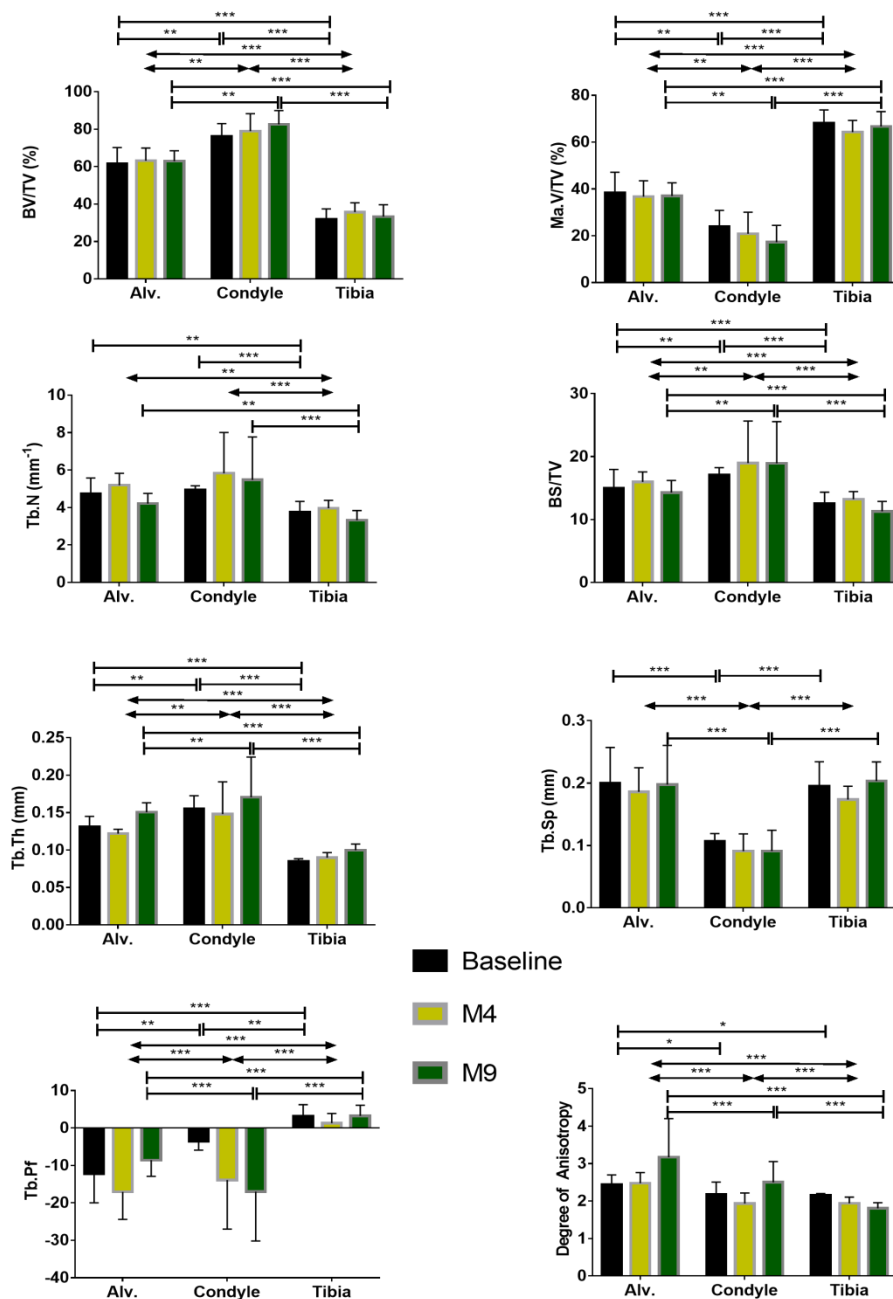


Figure 23 : Paramètres de microarchitecture osseuse dans le groupe SHAM au cours du temps (baseline, M4 et M9), *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.0001

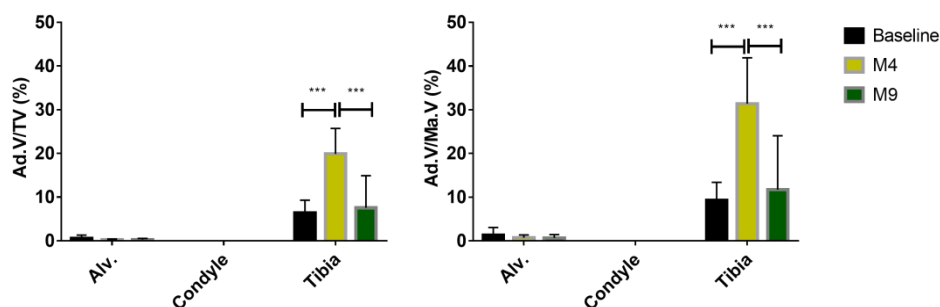


Figure 24 : Paramètres d'adiposité médullaire dans le groupe SHAM au cours du temps (baseline, M4 et M9), montrant un contenu adipeux médullaire en faible quantité dans la mandibule comparé au tibia, *p<0.05, **p<0.01, *** p<0.0001

VI. Ovariectomie

1. Rationnement alimentaire (pair-feeding)

La comparaison des paramètres de microarchitecture osseuse et d'adiposité médullaire dans l'os alvéolaire, le condyle et le tibia entre les groupes OVX_AL et OVX_PF montre l'absence de différences significatives à M4 comme à M9 (Fig.25).

2. Microarchitecture osseuse trabéculaire

La comparaison des paramètres de microarchitecture osseuse trabéculaire entre les groupes SHAM et OVX_AL montre des modifications site-dépendantes.

Dans le tibia, on observe à M4 post-OVX une diminution du volume osseux (BV/TV) d'environ -62% et de la densité trabéculaire (Tb.N) de -64%, associée à une augmentation de plus de +25% du volume de moelle (Ma.V/TV) par rapport au groupe SHAM ($p < 0.0001$). On note également à M4 post-OVX une diminution d'environ -65% de la surface osseuse (BS/TV), associée à une augmentation d'environ +10% de l'épaisseur de travées (Tb.Th), et de la distance inter-travées (Tb.Sp) d'environ +65% par rapport au groupe SHAM (+150%, $p < 0.0001$). Enfin, l'indice de fragmentation trabéculaire augmente d'un facteur environ égal à 10 à M4 post-OVX (+ 956%, $p < 0.0001$). Les variations des paramètres micro-architecturaux à M9 sont semblables à ceux observés à M4 dans le tibia (Fig. 25).

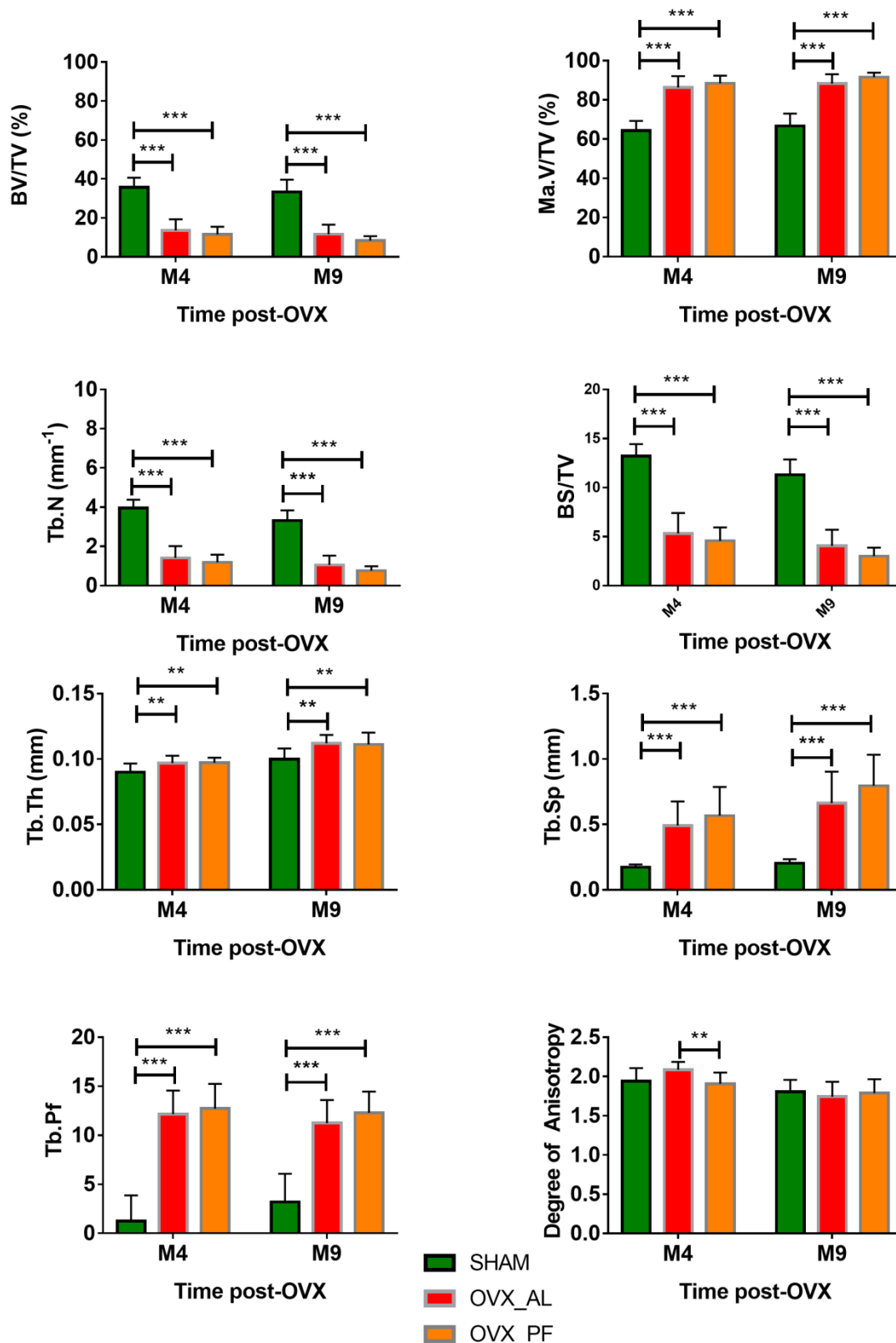


Figure 25 : Paramètres de microarchitecture osseuse dans les 3 groupes (SHAM, OVX_AL, OVX_PF) à M4 et M9 post-ovariectomie dans le tibia. *p<0.05, **p<0.01, *** p<0.0001

Dans l'os alvéolaire, les effets de l'ovariectomie se traduisent par une diminution du volume osseux (BV/TV) allant de -15% à M4 jusqu'à -20% à M9 ($p < 0.0001$) ainsi que de la densité trabéculaire (Tb.N) de -19% à M4 ($p < 0.0001$) sans variation de l'épaisseur des travées (Tb.Th) associées. On note également une augmentation du volume de moelle (Ma.V/TV) de +20% à M4 et de +26% à M9, une diminution de -12% de la surface osseuse (BS/TV) à M4 et une augmentation de la distance inter-travées (Tb.Sp) de +10% à M4 jusqu'à +28,5% à M9. (Fig 26).

Dans le condyle, aucune variation du volume osseux ni du volume de moelle osseuse n'a pu être mise en évidence à M4 et M9 post-OVX. En revanche, on observe une diminution jusqu'à -25% de la surface osseuse à M9 et jusqu'à -35% de la densité trabéculaire à M9 ($p < 0.0001$). De plus, on constate une augmentation de l'épaisseur des travées de +26% à M9, de l'indice de fragmentation trabéculaire d'un facteur supérieur à 6 (+684%, $p = 0.0019$) et de la distance inter-travées de +40% uniquement observée à M9 ($p = 0.0399$). Enfin, le degré d'anisotropie est augmenté de +31,8% à M4 ($p = 0.0015$) (Fig. 27).

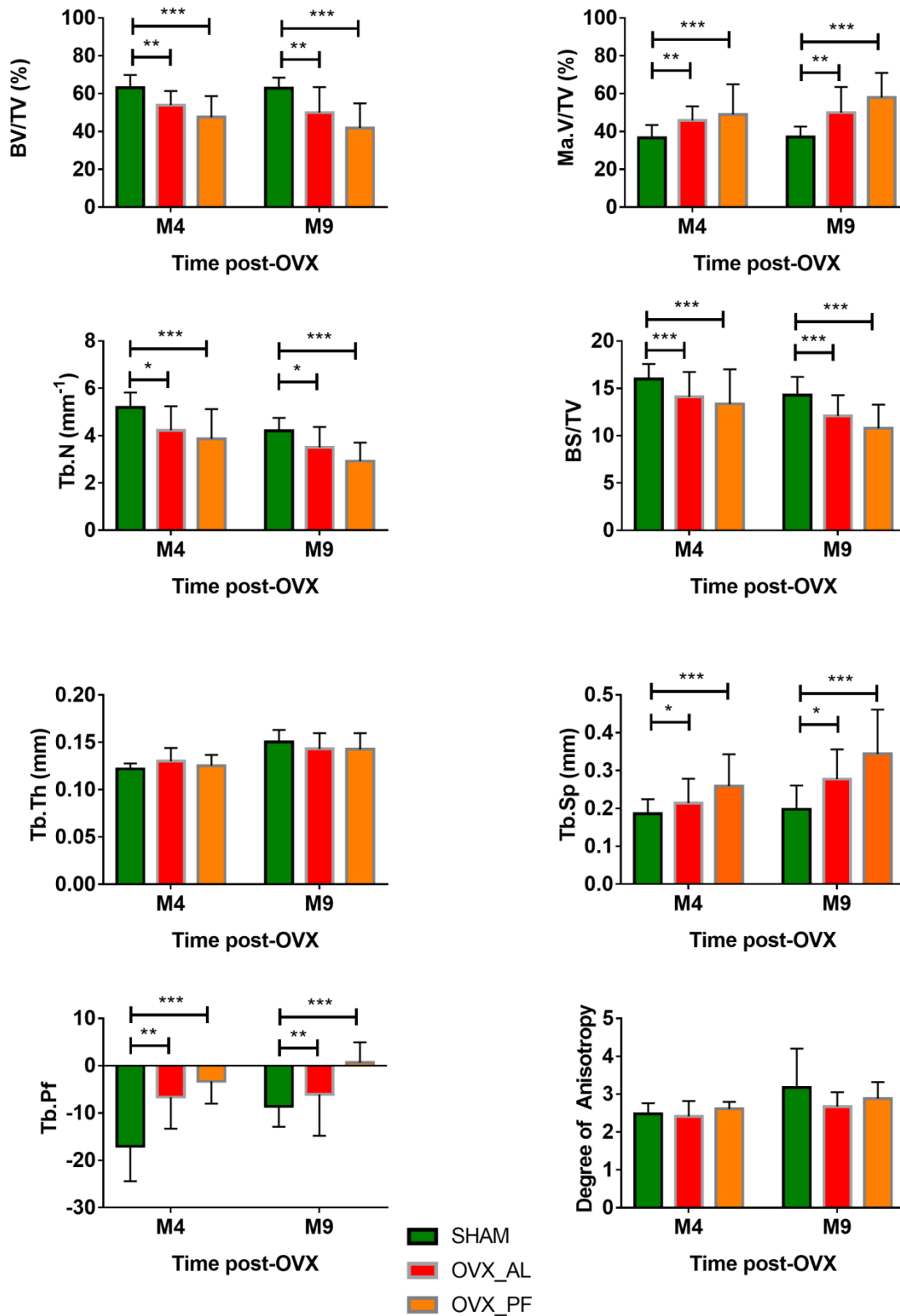


Figure 26 : Paramètres de microarchitecture osseuse dans les 3 groupes (SHAM, OVX_AL, OVX_PF) à M4 et M9 post-ovariectomie dans l'os alvéolaire, *p<0.05, **p<0.01, *** p<0.0001

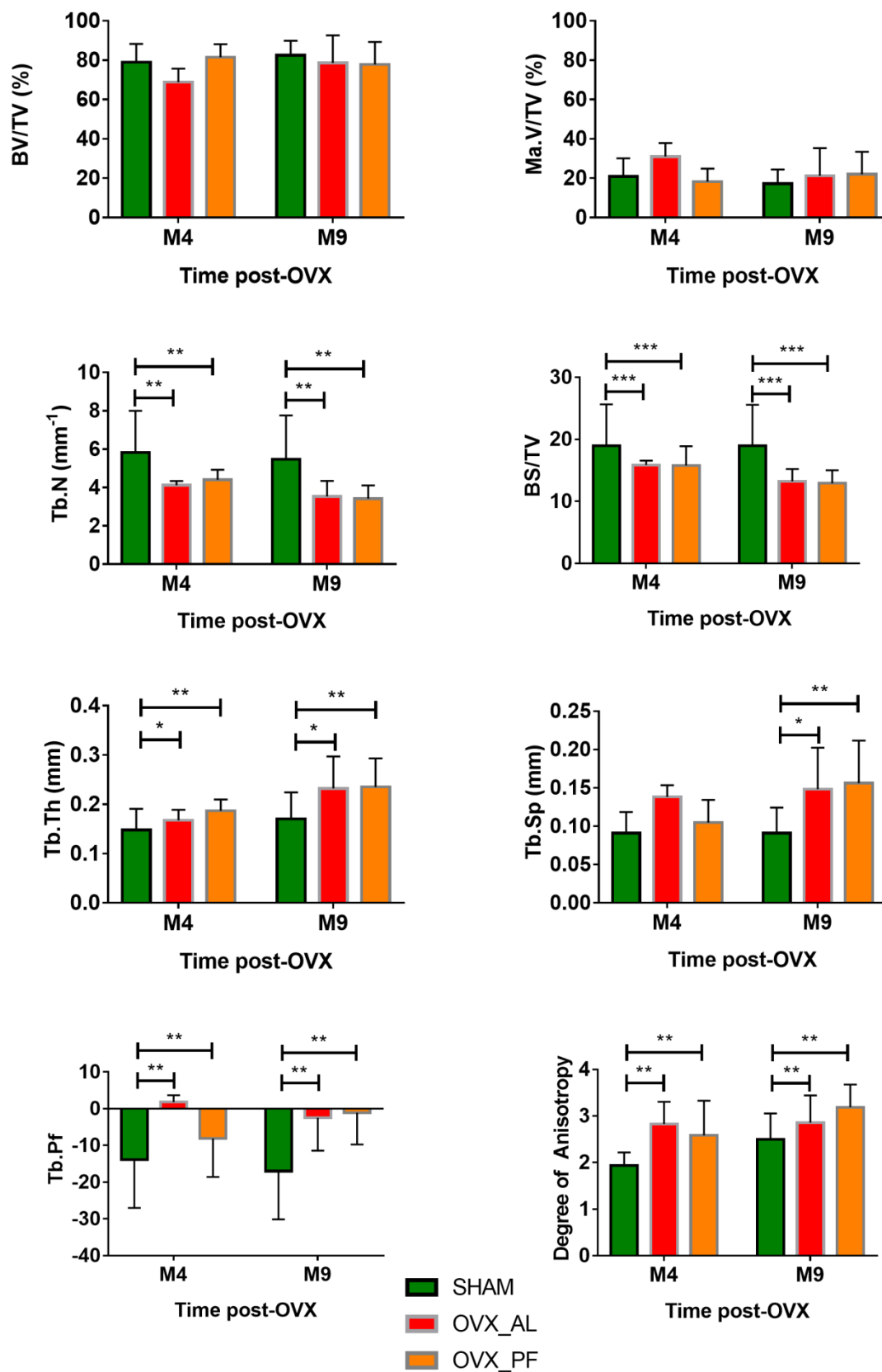


Figure 27 : Paramètres de microarchitecture osseuse dans les 3 groupes (SHAM, OVX_AL, OVX_PF) à M4 et M9 post-ovariectomie dans le condyle, *p<0.05, **p<0.01, *** p<0.0001

3. Contenu adipeux médullaire

Après ovariectomie, la perte osseuse observée dans le tibia s'accompagne d'une augmentation du contenu adipeux médullaire à M4 et M9. En effet, on note une augmentation significative de l'Ad.V/Ma.V de +51% à M4 et de +337% à M9 par rapport au groupe SHAM (Fig. 28).

Dans l'os alvéolaire, la perte osseuse s'accompagne également d'une augmentation significative de l'Ad.V/Ma.V, uniquement dans le groupe OVX_PF de +1908% à M4 et de +1256% à M9 par rapport au groupe SHAM.

Dans le condyle, aucune perte osseuse n'a été mise en évidence mais un contenu adipeux en faible quantité apparaît à M4 post-OVX (1-2% du volume de moelle disponible) et atteint ~10% à M9 post-OVX.

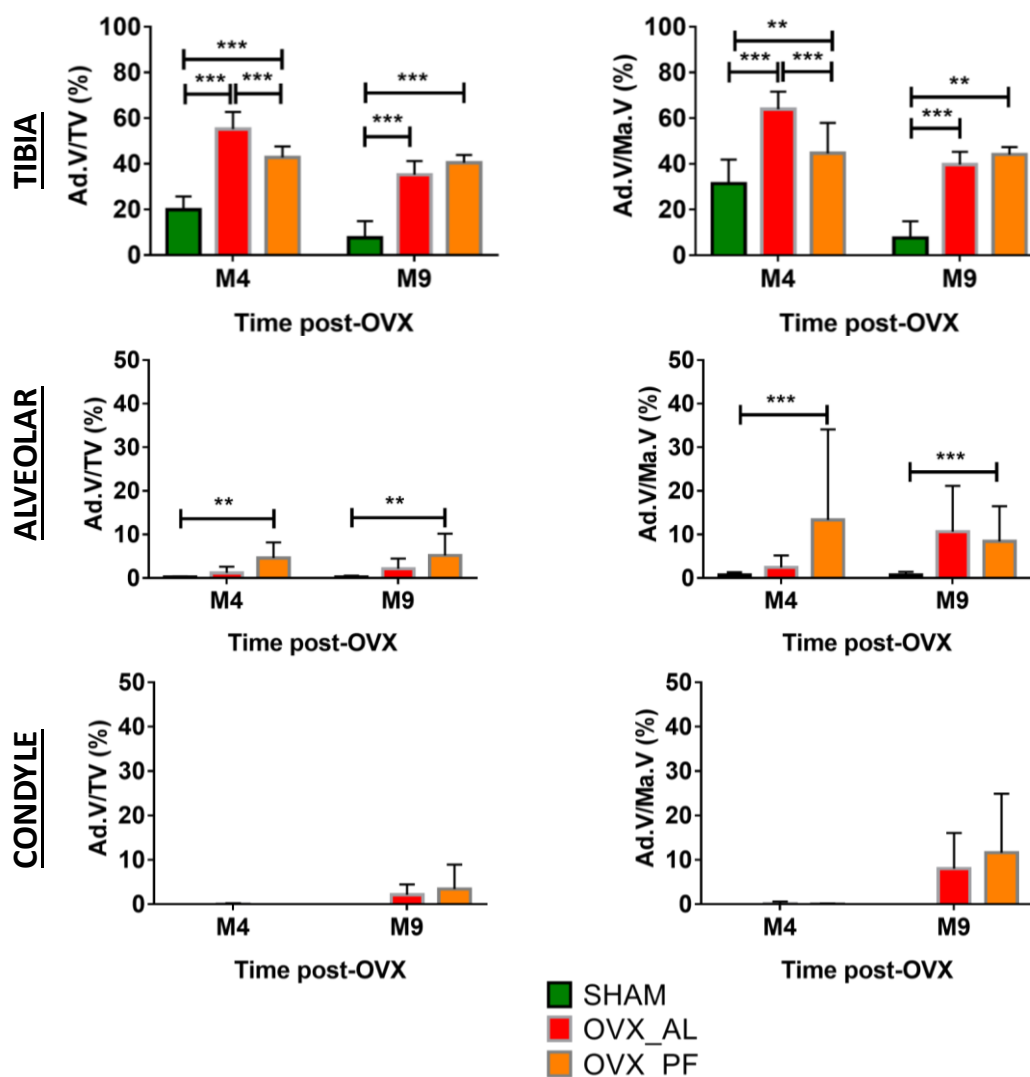


Figure 28 : Paramètres d'adiposité médullaire dans les 3 sites (tibia, os alvéolaire, condyle) à M4 et M9 post-ovariectomie. *p<0.05, **p<0.01, *** p<0.0001

4. Etude des corrélations entre les paramètres de microarchitecture osseuse et d'adiposité médullaire

L'étude des corrélations entre les paramètres mesurés de microarchitecture osseuse et d'adiposité médullaire a été réalisée pour chaque site afin de déterminer l'intensité de l'association de ces variables au sein des groupes SHAM et OVX (AL et PF poolés). Aucune corrélation n'a été retrouvée dans les groupes SHAM quel que soit le site étudié. En revanche, dans les groupes OVX, des corrélations entre les paramètres de microarchitecture osseuse et d'adiposité médullaire ont été retrouvées dans le tibia uniquement. En effet, des corrélations positives sont retrouvées entre le paramètre d'adiposité médullaire Ad.V/Ma.V et les paramètres microarchitecturaux BS/BV et DA ainsi qu'une corrélation négative entre Ad.V/Ma.V et Tb.Th (Fig. 29).

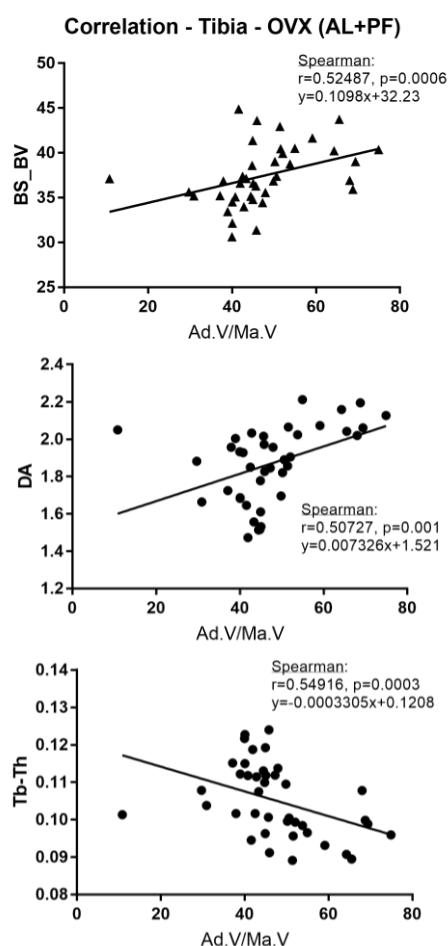


Figure 29 : Droites de régression linéaire obtenues entre les paramètres BS/BV, DA et Tb.Th dans le tibia au sein des groupes OVX (*ad libitum* et pair-feedé). Test non paramétrique de corrélation de rang de Spearman. Le coefficient de corrélation, l'équation de la droite et le niveau de significativité p sont indiqués.

5. Distribution de l'adiposité médullaire et relation spatiale avec la surface osseuse trabéculaire

Les histogrammes ci-dessous illustrent le profil de distribution de l'adiposité médullaire au sein de chaque site (Fig. 30). Ils expriment le pourcentage d'adiposité médullaire présent dans chaque bande, distante respectivement de 20µm, 40µm, 60µm, 80µm puis 100µm de la surface osseuse trabéculaire (ratio Ad.V/Ma.V par volume de bande correspondant à un degré de saturation adipocytaire par bande).

Dans le tibia, le contenu adipeux médullaire se situe préférentiellement au contact de l'os trabéculaire après ovariectomie et plus à distance dans le groupe contrôle. En effet, le contenu adipeux est non seulement plus important jusqu'à 100 µm de la surface osseuse dans le groupe OVX_AL comparé au groupe SHAM mais également situé préférentiellement au contact des travées. A M4 post-OVX, 87% de la surface osseuse est tapissée par des adipocytes dans le groupe OVX_AL vs 40% dans le groupe SHAM. Cet accollement d'adipocytes au contact des travées osseuses n'est pas observé dans le groupe OVX_PF.

En revanche, dans l'os alvéolaire, le contenu adipeux médullaire est réparti principalement à partir de 40-100 µm de la surface osseuse trabéculaire à M4 post-OVX et a tendance à se rapprocher de la surface osseuse à M9 post-OVX avec peu de contacts avec la surface osseuse (<5%). Des différences de répartition d'adiposité médullaire ont pu être mises en évidence uniquement à M9 post-OVX entre les groupes SHAM et OVX_AL mais dès M4 post-OVX entre les groupes OVX_PF et SHAM.

Dans le condyle, le contenu adipeux apparaît tardivement et plus à distance de la surface osseuse trabéculaire, comparativement au tibia et à l'os alvéolaire (40 à 100µm de la surface osseuse).

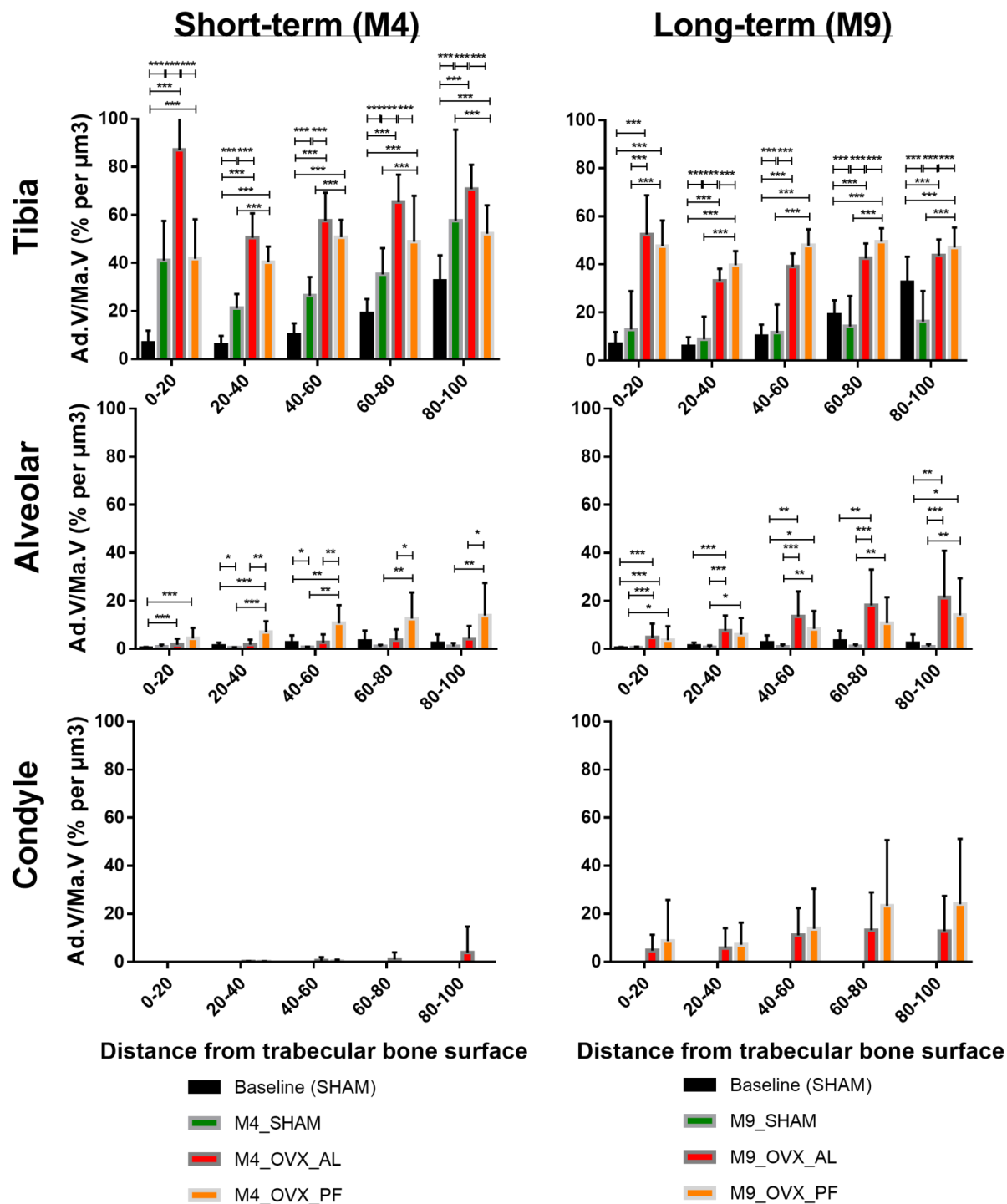


Figure 30 : Distribution de l'adiposité médullaire (0-100µm) à court et long terme dans chaque groupe (Baseline, SHAM, OVX_AL, OVX_PF) au sein de chaque site (tibia, os alvéolaire, condyle), *p<0.05, **p<0.001, ***p<0.0001

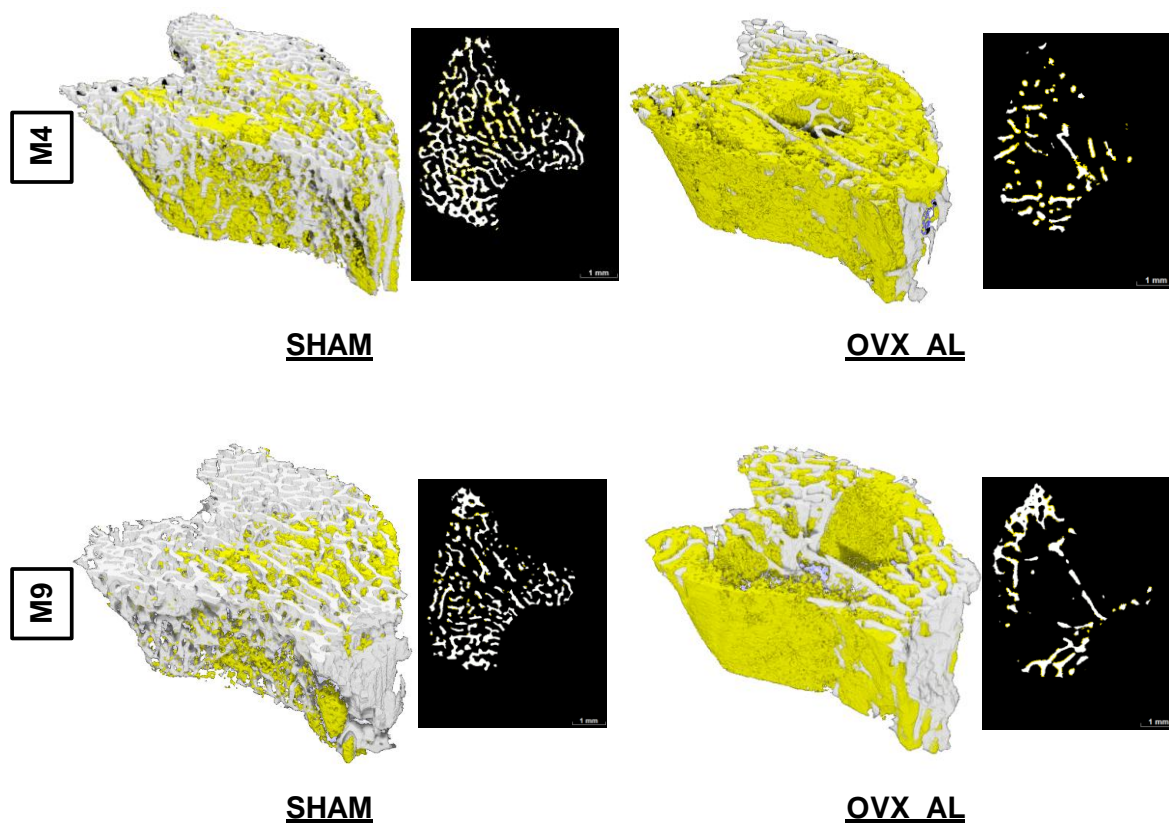


Figure 31 : Représentations 3D de la microarchitecture (en blanc) et de l'adiposité médullaire (en jaune) après marquage à l'osmium dans la métaphyse proximale du tibia à M4 (en haut) et M9 (en bas) dans les groupes SHAM (à gauche) et OVX_AL (à droite). A chaque représentation volumique est associée une cross-section transversale illustrant l'adiposité médullaire au contact de la surface osseuse trabéculaire (0-20 μ m).

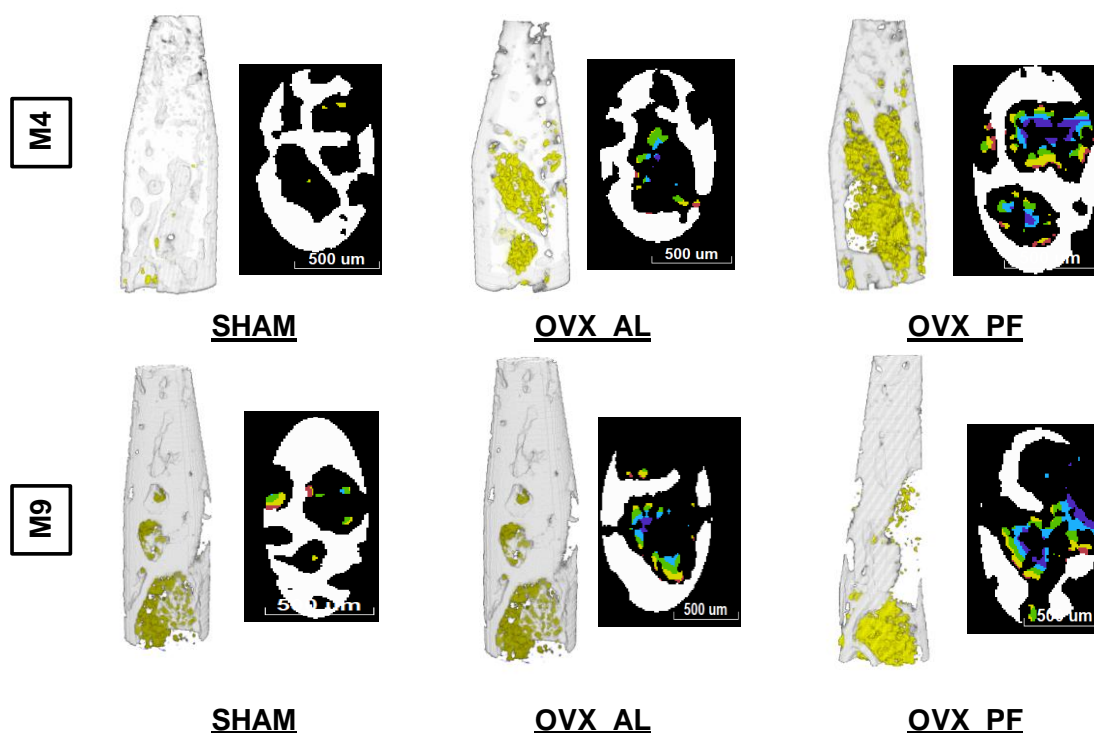


Figure 32 : Représentations 3D de la microarchitecture (en blanc) et de l'adiposité médullaire (en jaune) après marquage à l'osmium dans l'os alvéolaire à M4 (en haut) et M9 (en bas) dans les groupes SHAM (à gauche), OVX_AL (au milieu) et OVX_PF (à droite). A chaque représentation volumique est associée une cross-section transversale illustrant la distribution d'adiposité médullaire en relation avec la surface osseuse trabéculaire (rouge : 0-20µm, jaune : 20-40µm, vert : 40-60µm, bleu : 60-80µm, violet : 80-100µm)

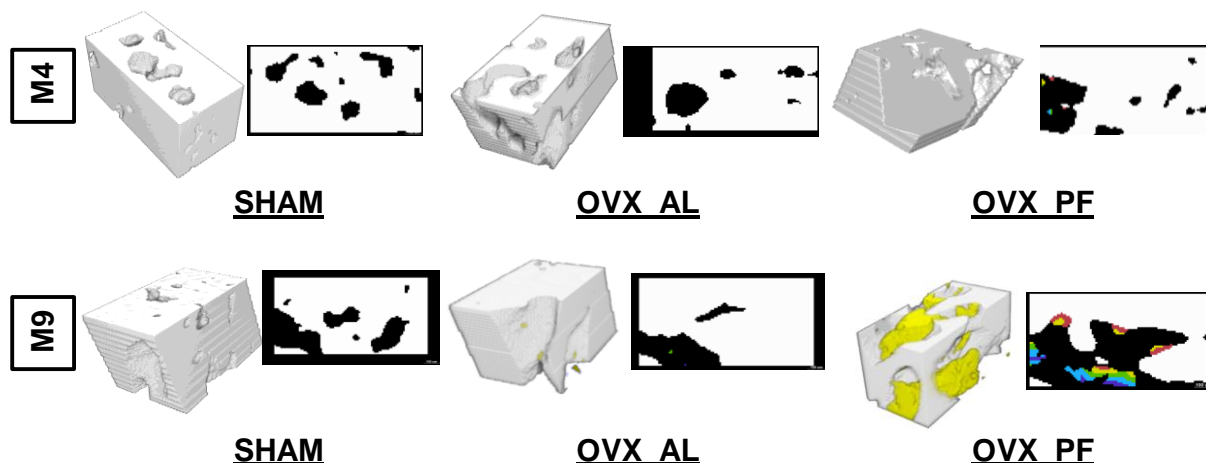


Figure 33 : Représentations 3D de la microarchitecture (en blanc) et de l'adiposité médullaire (en jaune) après marquage à l'osmium dans le condyle à M4 (en haut) et M9 (en bas) dans les groupes SHAM (à gauche), OVX_AL (au milieu) et OVX_PF (à droite). A chaque représentation volumique est associée une cross-section transversale illustrant la distribution d'adiposité médullaire en relation avec la surface osseuse condylienne (rouge : 0-20µm, jaune : 20-40µm, vert : 40-60µm, bleu : 60-80µm, violet : 80-100µm)

6. Apport de l'analyse statistique multivariée

L'analyse en Composantes Principales (ACP) permet d'explorer les relations entre les variables et les échantillons de manière graphique. La figure 33 présente les score plots et les loading plots issus de l'ACP sur les données des tibias SHAM et OVX_AL à M4. Le score plot représente la répartition des échantillons dans l'espace défini PC1 et PC2. Les axes PC1 et PC2 sont issus de la combinaison linéaire des variables (les données microCT). Les composantes principales sont décrites dans les loading plots.

Les score plots (Fig. 34-A.a)) montrent 2 nuages de points distincts et formés par les échantillons tibia SHAM M4 d'un côté, et tibia OVX_AL M4 de l'autre. La séparation est principalement observée le long de l'axe PC1. L'axe PC1 explique 69,62% de variation dans le jeu de données. Les loading plots (Fig. 34 A.b)) montrent les données microCT qui expliquent le plus la différence entre les 2 groupes. Les données les plus influentes sont BV/TV, Tb.N et BS/TV pour le groupe tibia SHAM M4. Les données les plus influentes sont Tb.Th, Tb.Pf, Ma.V/TV, Ad.V/TV et Ad.V/Ma.V pour le groupe tibia OVX_AL M4. Ces résultats sont aussi observés lors de l'ACP sur le jeu de données tibia SHAM M9 et tibia OVX_AL M9 (Fig. 34 B.c) et d)).

L'ACP a été conduite sur les jeux de données relatifs à la mandibule (os alvéolaire et condyle). Cependant, aucune séparation claire et distincte n'a été observée. Aussi, par souci de clarté, seuls la séparation des groupes OVX et SHAM dans le tibia et leurs paramètres caractéristiques sont représentés (Fig 34).

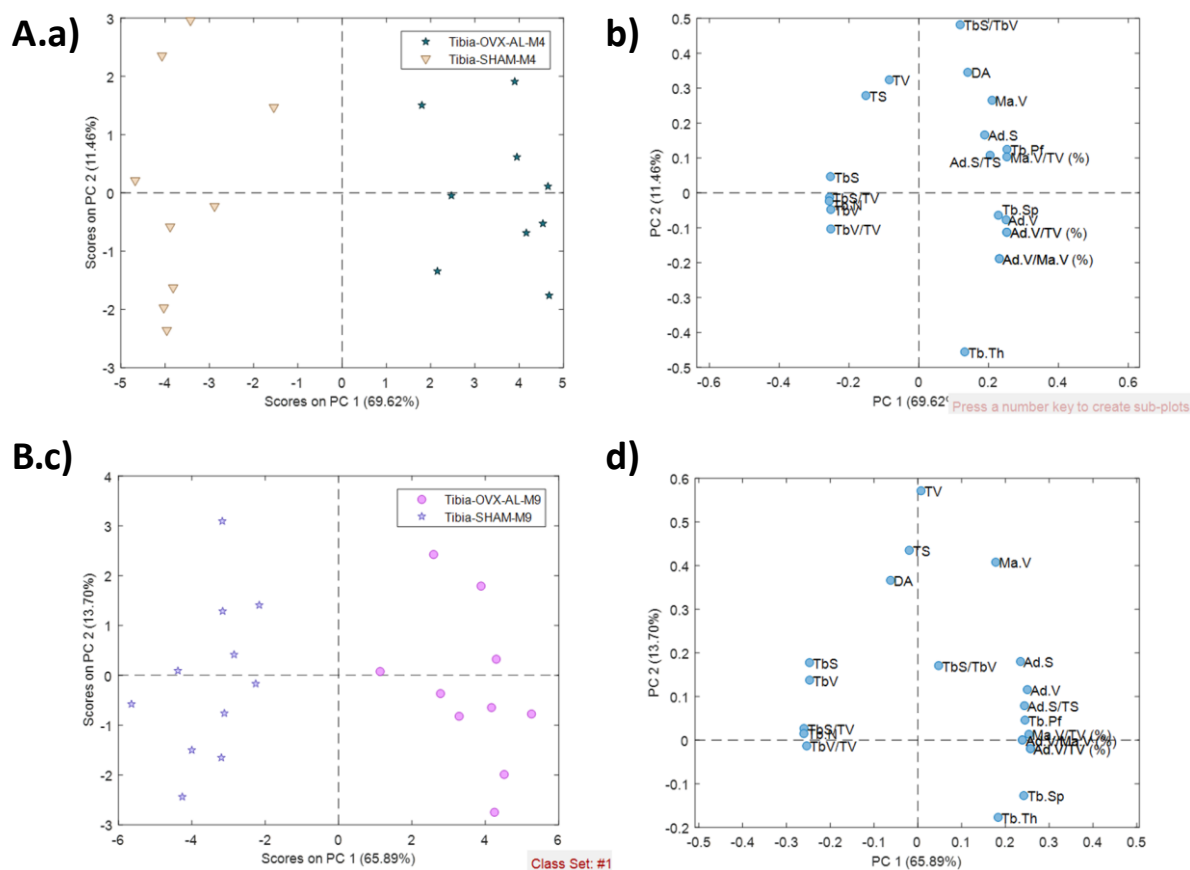


Figure 34 : Résultats graphiques de l'Analyse en Composantes Principales (PCA) pour les échantillons de tibia à court et long terme entre SHAM et OVX_AL.

A gauche : Score plots représentant la répartition des échantillons dans l'espace défini par PC1 et PC2.

A droite : Loading plots représentant la contribution de chaque variable dans l'espace défini par PC1 et PC2.

A. ACP des données microCT sur les tibias SHAM vs OVX_AL à M4, a) score plots, b) loading plots ;

B. ACP des données microCT sur les tibias SHAM vs OVX_AL à M9, c) score plots, d) loading plots.

Les principaux paramètres discriminants de chaque groupe sont les suivants :

- Groupe SHAM : BS/TV, Tb.N et BV/TV
- Groupe OVX_AL : Tb.Pf, Tb.Sp, Ma.V/TV, Ad.V/Ma.V et Tb.Th

Aucune séparation claire et distincte n'a été obtenue entre les données du groupe OVX_AL et OVX_PF (données non illustrées). Pour résumer, l'ACP montre que les groupes tibia OVX_AL M4 et M9 sont caractérisés par une contribution plus importante de paramètres d'adiposité par rapport au groupe SHAM.

Cette analyse confirme les modifications microarchitecturales et adipocytaires observées et illustrent que l'ovariectomie se caractérise par des modifications ostéo-médullaires et adipocytaires marquées dans le tibia.

CHAPITRE 5 : DISCUSSION GENERALE

Dans ce travail de thèse, nous avons mis au point une méthodologie originale d'évaluation tridimensionnelle simultanée de la microarchitecture osseuse, du contenu et de la distribution adipeuse médullaire, permettant ainsi d'apporter des éléments de discussion sur le rôle local de l'adiposité médullaire au cours du vieillissement et de l'ostéoporose induite par ovariectomie. De plus, nous avons montré les spécificités de la mandibule en précisant les modifications osseuses et médullaires au cours du vieillissement ainsi qu'à court et long terme après ovariectomie chez la ratte adulte (squelette mature). Les altérations de la microarchitecture osseuse trabéculaire dans la mandibule sont moins marquées que dans le tibia et s'accompagnent d'une augmentation de l'adiposité médullaire plus tardive et plus à distance de la surface osseuse trabéculaire.

I. Spécificités de site à baseline

L'analyse des données du groupe SHAM à baseline montre des différences de microarchitecture osseuse et de distribution adipocytaire entre tibia proximal, os alvéolaire et condyle dans la mandibule justifiant l'intérêt d'une analyse multi-sites.

En effet, les paramètres microarchitecturaux mesurés en site mandibulaire denté (os alvéolaire) et non denté (condyle) traduisent une microarchitecture osseuse dense en comparaison avec celle de la métaphyse proximale du tibia (BV/TV : + 50%, Tb.N : +20%, Tb.Th : +40%). Parmi les 3 localisations squelettiques analysées, le volume osseux trabéculaire était plus élevé dans le condyle, avec un volume trabéculaire moyen de 75%, suivi de l'os alvéolaire (61,5%) et enfin de la métaphyse proximale du tibia (32%). Ce volume osseux plus élevé dans le condyle est associé à une épaisseur et une densité trabéculaires moyennes plus élevées et à une distance inter-trabéculaire moyenne deux fois moindre par rapport au tibia ou à l'os alvéolaire. Des différences microarchitecturales au sein de la mandibule ont été décrites par Choi *et al.* qui ont rapporté chez l'Homme une microarchitecture plus dense dans le condyle en présence de dents dans les secteurs postérieurs en

comparaison avec des sujets édentés (195–197). Le maintien de la fonction masticatrice chez les rats (dentés dans cette étude) pourrait expliquer cette microstructure plus dense dans le condyle par rapport à l'os alvéolaire. De plus, la valeur négative de l'indice de fragmentation du réseau trabéculaire (Tb.Pf) indique un réseau trabéculaire plus connecté et une prévalence de cavités fermées avec des surfaces concaves dans la mandibule, tandis que la valeur positive de cet indice indique une structure trabéculaire moins connectée, avec une prédominance de cavités ouvertes avec des surfaces convexes dans la métaphyse proximale du tibia. La microarchitecture osseuse est aujourd'hui reconnue comme un paramètre important de la qualité osseuse, au même titre que d'autres facteurs tel que le niveau de remodelage osseux ou encore la composition moléculaire (198). Elle représente une réponse adaptative aux variations de contraintes mécaniques (199). Le réseau trabéculaire forme une structure complexe interconnectée résistante aux forces qui lui sont soumises et peut être étudié par des techniques morphométriques en microtomographie à RX (200–202). Ces différences entre les sites squelettiques pourraient être en partie expliquées par les sollicitations mécaniques masticatoires, entraînant des charges cycliques différentes dans la mandibule par rapport au tibia chez le rat (37,203). Un taux de renouvellement osseux plus élevé a également été rapporté dans les mâchoires (44,132).

Grâce à notre nouvelle approche par microCT, nous avons pu mettre en évidence une distribution spatiale du contenu adipeux médullaire différente entre le tibia et la mandibule chez le rat. Dans la métaphyse proximale du tibia, le contenu adipeux maximal (~ 20% de la fraction adipeuse médullaire totale) était situé près de la surface osseuse (20 μm), alors que dans l'os alvéolaire, le contenu adipeux maximal (~ 30% de la fraction adipeuse médullaire totale) était situé entre 40 et 60 μm de la surface osseuse trabéculaire à baseline.

De manière intéressante, dans le tibia, une corrélation négative a été trouvée entre le pourcentage d'adiposité (Ad.V/TV) et l'épaisseur trabéculaire ($r=-0,74$, $p=0,037$) suggérant une possible association entre le contenu adipeux médullaire et la microarchitecture osseuse trabéculaire. Dans la mandibule, aucune corrélation entre les paramètres de microarchitecture osseuse et d'adiposité médullaire n'a été retrouvée. Un contenu adipeux quasi-nul (<1% de moelle) a été observé dans le

condyle des rattes âgées de 6 mois. Le suivi de la croissance osseuse par mesure de la longueur des os (tibia et mandibule) au sacrifice des animaux montre qu'à M4 (10 mois d'âge), la croissance osseuse des rattes est achevée. Ainsi, l'âge est un aspect important qui a été pris en considération dans la présente étude.

II. Altérations ostéo-médullaires dans le tibia

1. Au cours du vieillissement

Dans notre étude, l'analyse comparative des paramètres obtenus chez les animaux du groupe SHAM ne montre aucune différence microarchitecturale entre baseline et M4, baseline et M9 et M4 et M9 dans le tibia. Cette absence de différence liée au vieillissement pourrait être expliquée par l'âge avancé des animaux au début du protocole de suivi (6 mois) et par un taux de remodelage plus lent avec l'âge.

Des modifications de la microarchitecture ont été décrites chez des animaux plus jeunes (3 mois) encore en croissance. En 2005, Waarsing *et al.* ont rapporté les principales altérations microarchitecturales osseuses liées au vieillissement et à l'ovariectomie chez la ratte wistar âgée de 10 mois au début du protocole par superposition de jeux de données d'images microCT acquis respectivement à baseline, +4, +14, +34 et +54 semaines (204). Dans le groupe SHAM, une perte osseuse lente et continue associée à une perte de connectivité trabéculaire linéaire a été rapportée au cours du vieillissement. Dans cette étude, une forte corrélation positive entre le volume osseux trabéculaire et l'épaisseur des travées a été retrouvée. L'absence de variations des paramètres microarchitecturaux et les faibles variations du contenu adipeux médullaire observées au cours du vieillissement peuvent être associées à un suivi de plus courte durée et/ou à la souche de rat différente (Wistar vs Sprague-dawley) dans notre étude.

Les données humaines rapportent une ostéopénie sénile (-15 à 25% volume osseux trabéculaire) avec une balance négative du turn-over osseux (81,205,206).

Les analyses histomorphométriques et l'imagerie indiquent que les mécanismes à l'origine de cette perte osseuse diffèrent selon le sexe, l'âge (207–209) et la localisation anatomique (210). Cette perte osseuse s'accompagne d'une résistance à la compression amoindrie des os longs et des vertèbres (211–215). Les travaux d'Eriksen et Mosekilde rapportent une plus importante activité de résorption avec des plages osseuses résorbées plus profondes chez les femmes autour de la ménopause que chez les hommes de même âge (216,217). De plus, Henriksen *et al.* ont montré que l'ostéoclastogenèse se faisait préférentiellement à proximité de plages d'os anciens (218). Les mécanismes principaux de cette perte osseuse liée à l'âge, et apparaissant en amont des troubles hormonaux observés à la ménopause, seraient :

- une diminution de la formation osseuse chez l'Homme aboutissant à une diminution volumique homogène du réseau trabéculaire (amincissement réversible des travées osseuses au profit d'un volume médullaire élargi) (145,219) ;
- une augmentation de la résorption osseuse chez la femme associée à une perte de connectivité des trabécules horizontales et une fragmentation du réseau trabéculaire (augmentation du Tb.Pf indiquant des modifications précoces de l'os trabéculaire) (220–223).

2. Au cours de l'ovariectomie

L'ovariectomie a été confirmée au sacrifice des animaux par constatation d'une atrophie utérine dans les groupes OVX_AL et OVX_PF (perte de plus de 80% de poids des uteri après ovariectomie) par rapport à leurs homologues SHAM. La perte osseuse après OVX s'effectue en deux temps : d'abord rapide avec fragmentation du réseau trabéculaire (perte de connectivité trabéculaire >80%) ne permettant que le maintien des travées les plus épaisses (augmentation du Tb.Th) et les plus connectées suivie d'une perte osseuse plus lente et plus progressive entre les semaines 14 à 54 chez le rat (120,226–228).

L'ovariectomie conduit à une perte osseuse avec une diminution du BV/TV de l'ordre de -62% dans le tibia à M4 ($p < 0.0001$). Wronski *et al.* décrit une perte osseuse trabéculaire au niveau de la métaphyse proximale du tibia débutant 2 semaines après ovariectomie comparativement au groupe SHAM avec un effet plateau atteint vers la 14^e semaine (182). Les effets de l'ovariectomie sur la microarchitecture osseuse rapportés dans ce travail sont en accord avec la littérature (120,229,230). Francisco *et al.* ont montré que la microarchitecture trabéculaire n'est pas affectée par l'augmentation du poids corporel des animaux du groupe OVX par rapport à leurs homologues SHAM (179). Notre étude révèle que les modifications de la microarchitecture osseuse ne sont pas uniformes dans tous les sites. La métaphyse proximale du tibia a présenté les différences les plus précoces et les plus importantes entre les groupes OVX et SHAM par rapport à la mandibule (204,226,227).

Les variations de la microarchitecture osseuse témoignent de la qualité osseuse et des conséquences sur le risque fracturaire. En effet, le paramètre BV/TV seul n'explique que 76% de la solidité osseuse tandis que le BV/TV associé aux autres variables microarchitecturales expliquent plus de 90% de cette variable (231). De plus, la baisse de la densité trabéculaire d'environ 65% associée à la fragmentation du réseau trabéculaire dans le tibia après ovariectomie suggère la susceptibilité plus importante à la fracture rapportée au niveau des os longs (232). Legrand *et al.* ont aussi démontré que la perte de connectivité au sein du réseau

trabéculaire constituait un facteur de risque de fractures, indépendant de la densité minérale osseuse DMO dans le squelette axial (233). De plus, Seeman *et al* expliquent que la baisse de densité trabéculaire (Tb.N) associée à une hausse de l'épaisseur trabéculaire résultent de défauts structuraux suite au déséquilibre non compensé du remodelage osseux en faveur d'une résorption osseuse excessive (148).

La quantité d'adiposité médullaire dans le tibia a triplé à M9 après ovariectomie. Dans de nombreuses pathologies caractérisées par une perte osseuse (OP post-ménopausique, OP de l'anorexie mentale...), la faible masse osseuse est associée à une augmentation de l'adiposité médullaire et des marqueurs d'expression génique spécifiques des adipocytes (PPAR γ) aux dépens d'une activité hématopoïétique amoindrie (81). Cette relation os-adiposité médullaire a été observée localement de manière site-spécifique (14,140). Chez des femmes saines âgées de 30 à 100 ans, cette corrélation apparaît en site iliaque comme étant dépendante de l'âge des sujets (86).

Chez des sujets jeunes âgés de 15 à 25 ans (choisis pour s'affranchir des effets de la croissance), Di Iorgi *et al.* ont montré, qu'après acquisition du pic de masse osseuse, la formation osseuse, au sein du squelette axial comme appendiculaire, est inversement proportionnelle à celle de l'adiposité médullaire, et ce, de façon indépendante du sexe (92,234). De manière intéressante, Griffith *et al.* ont montré que la conversion adipeuse liée à l'âge augmente de manière plus marquée chez les femmes ménopausées. En effet, comparativement aux hommes de même âge, les femmes ménopausées ont une fraction adipeuse médullaire 10% supérieure (89). La répartition de l'adiposité préférentiellement au contact de la surface osseuse trabéculaire après ovariectomie dans le tibia suggère un rôle régulateur local de l'adiposité médullaire dans le métabolisme osseux.

III. Altérations ostéo-médullaires dans la mandibule

1. Au cours du vieillissement

Dans ce travail, l'analyse comparative des paramètres obtenus chez les rattes SHAM âgées respectivement de 6, 10 et 15 mois ne montre aucune différence microarchitecturale dans la mandibule liée au vieillissement. A notre connaissance, aucune autre étude n'a décrit les modifications microarchitecturales en site mandibulaire au cours du vieillissement chez le rat. En revanche, dans une étude récente, une corrélation négative entre l'âge et la DMO corticale mandibulaire et maxillaire a été observée chez l'Homme sans mettre en évidence de relation entre l'âge et la DMO trabéculaire des sujets (235).

Parallèlement, un contenu adipeux médullaire inchangé a été constaté dans les 2 sites mandibulaires (os alvéolaire et condyle) des rattes SHAM à M4 et à M9.

2. Au cours de l'ovariectomie

Dans la mandibule, l'existence d'une ostéoporose est sujet à controverse (19). Plusieurs facteurs confondants rendent complexe l'analyse de la littérature : vieillissement, ostéoporose, maladie parodontale avec composante inflammatoire /infectieuse. Néanmoins, diverses études ont rapporté une association entre la perte de DMO mesurée par DEXA à la hanche ou au rachis d'une part, et la perte osseuse alvéolaire et basale mandibulaire (21), les maladies parodontales (236) ou encore la perte des dents (24,237) d'autre part.

Dans notre modèle de rat, on note une perte osseuse après OVX uniquement dans l'os alvéolaire de l'ordre de 15% à M4 (court terme) associée à une diminution de la densité trabéculaire de l'ordre de 20%. Une variation du même ordre de grandeur des paramètres est observée à M9 (long terme). Dans le condyle, l'absence de perte osseuse à court comme à long terme s'accompagne néanmoins d'une diminution de la densité trabéculaire de l'ordre de 35% associée à une

augmentation de 26% de l'épaisseur des travées résiduelles. Ces variations microarchitecturales témoignent d'une vraisemblable rupture des travées les plus minces. L'augmentation du degré d'anisotropie (DA) après ovariectomie dans le condyle pourrait être le résultat d'une réorganisation du réseau trabéculaire avec une plus faible quantité de travées horizontales, perpendiculaires au grand axe de contrainte (223).

Le paramètre BS/TV, représentant la surface osseuse spécifique, a été décrit comme un bon indice prédictif de la perte osseuse (238). La plus grande valeur retrouvée dans la métaphyse tibiale peut expliquer sa plus grande sensibilité à la perte osseuse par rapport à la mandibule. En effet, l'ovariectomie entraîne une réduction de BV/TV de l'ordre de 15% dans l'os alvéolaire, mais de l'ordre de 65% dans le tibia proximal à M9. Elovic et al. rapportent que dans la mandibule de jeunes rats adultes (~ 4 mois), l'ovariectomie conduit à une augmentation de +15% de la charge de rupture mais aucun changement de la densité minérale osseuse. Chez les rats plus âgés (~ 6 mois), l'ovariectomie conduit à une diminution de -8% de la fraction osseuse, mais n'induit aucun changement dans la charge de rupture ou la densité minérale osseuse de la mandibule (239,240). Dans les situations cliniques humaines de perte osseuse telles que l'ostéoporose, la relation entre l'altération mandibulaire et la prédiction de la fracture ostéoporotique est controversée et de faible sensibilité (241,242). Bien que certains auteurs aient rapporté une relation étroite entre la diminution de la DMO à la hanche ou au rachis et la perte osseuse et dentaire (parodontopathies) en site maxillo-mandibulaire (21,237,243,244), l'existence d'une ostéoporose de cette région reste encore aujourd'hui sujet à controverse (19,24). En comparaison avec le tibia et la tête fémorale, la perte osseuse trabéculaire induite par OVX dans les vertèbres lombaires est également retardée (pas avant la 7^e semaine) et atteint un effet plateau entre les semaines 39 et 77 post-OVX (93,229).

Pour normaliser les stimulations biomécaniques liées à l'activité masticatoire estimée comme étant 10 à 20% supérieure dans le groupe OVX_AL, un protocole de rationnement alimentaire a été mis en place et maintenu jusqu'au sacrifice des animaux (187). La nature et la capacité énergétique des apports alimentaires chez le rongeur montrent qu'un régime riche en graisse (high fat diet) augmente

significativement le contenu lipidique total de la moelle (en particulier les TGs et le cholestérol) comparativement aux sujets soumis à un régime alimentaire standard. Une hypophagie prolongée a été constatée dans le groupe OVX_PF au-delà de la 11^{ème} semaine après mise en du protocole de rationnement alimentaire (Fig 13-14). Cette hypophagie constatée n'a pour autant pas été accompagnée d'une perte de poids dans le groupe OVX_PF mais d'un ralentissement de la prise de poids (Fig 16). Jiang *et al.* ont rapporté l'absence d'impact du protocole de pair-feeding sur la densité minérale osseuse au niveau du fémur et des vertèbres lombaires chez le rat jeune (187). De manière intéressante, chez la ratte âgée, la conduite d'un protocole de pair-feeding semble donc ne pas avoir d'impact sur les paramètres microarchitecturaux et adipeux mesurés en site mandibulaire comme dans le tibia.

IV. Intérêts et limites du modèle utilisé

Grâce à l'approche développée dans ce travail utilisant la microtomographie à rayons X, couplée au marquage de l'adiposité médullaire au tétr oxyde d'osmium, la visualisation tridimensionnelle des structures osseuses et adipeuses médullaires, leur quantification et leur analyse topographique en rapport avec la surface osseuse trabéculaire constituent une avancée dans les moyens d'exploration de l'adiposité médullaire. Toutefois, l'impact de la décalcification sur la déformation morphologique du réseau trabéculaire et médullaire (effet de rétrécissement tissulaire ou « shrinkage ») n'est pas bien connu à ce jour. Cependant, le réalignement des SCAN 1 et 2 (étape de « registration » 3D des jeux de données avant/après marquage) a permis de limiter au maximum cet effet d'altération tissulaire.

L'utilisation d'un niveau de résolution inframillimétrique avec le nanoCT, le recours à un amplificateur de contraste des tissus mous qui soient moins toxiques que le tétr oxyde d'osmium (ex : polyoxometalate) constituent des pistes récentes et intéressantes de développement technologique. Ces pistes présentent divers avantages : l'absence de décalcification préalable au marquage des échantillons permettant l'analyse simultanée de la microarchitecture et des constituants médullaires avec une acquisition unique, la visualisation et l'analyse quantitative tridimensionnelle des plages osseuses plus ou moins minéralisées (« os jeune/os

vieu »), la microvascularisation osseuses et médullaires (245), ainsi que la caractérisation des adipocytes individuels (diamètres, localisations) (185). La poursuite de ces travaux et l'étude de l'impact de l'adiposité médullaire sur la minéralisation du tissu osseux après l'ovariectomie permettra de préciser le rôle de l'adiposité médullaire à l'échelle moléculaire et élémentaire.

CHAPITRE 6 : CONCLUSION-PERSPECTIVES

L'investigation et la compréhension de la relation entre l'adiposité médullaire (et ses médiateurs chimiques) et la qualité osseuse ont émergé ces dernières années comme de nouveaux champs pour la recherche. Il semble aujourd'hui qu'il faille prendre en considération l'adiposité médullaire lorsqu'on évalue les paramètres de qualité osseuse (246). L'adiposité médullaire constitue un dépôt de graisse hétérogène avec des adipocytes qui se distinguent, tant dans leur phénotype que dans leurs réponses aux stimuli en fonction de leur localisation dans l'os ainsi que de leur environnement dans la niche médullaire. Avec l'aide de notre nouvelle méthode de caractérisation tridimensionnelle permettant l'alignement de l'os et de l'adiposité médullaire, ce travail de thèse précise les spécificités du contenu adipeux médullaire et sa distribution dans l'os alvéolaire et le condyle de la mandibule de rat au cours du vieillissement et de l'ovariectomie.

A 6 mois, la **mandibule** de rat se distingue par une **microarchitecture osseuse trabéculaire plus dense** que dans le tibia avec un **contenu adipeux médullaire en faible quantité dans l'os alvéolaire et absent dans le condyle**. Ces spécificités de site sont maintenues à 10 et 15 mois d'âge.

Au cours du vieillissement, aucune modification de la microarchitecture osseuse ni du contenu adipeux médullaire n'a été constatée en site mandibulaire. En revanche, une augmentation du contenu adipeux médullaire dans le tibia a été observée à 10 mois, suivie d'une diminution à 15 mois sans modification des paramètres de microarchitecture osseuse.

Après ovariectomie, on observe à court comme à long terme :

➤ Dans le tibia :

- ✓ un volume osseux et une densité trabéculaire inférieurs
- ✓ un volume de moelle, une épaisseur de travées, un indice de fragmentation trabéculaire et une distance inter-travées supérieurs.
- ✓ une augmentation du contenu adipeux médullaire,

- ✓ une localisation du **contenu adipeux médullaire** préférentiellement **au contact des travées osseuses**.
- Dans l'os alvéolaire :
 - ✓ un volume osseux et une densité trabéculaire inférieurs
 - ✓ un volume de moelle, ainsi qu'une distance inter-travées supérieure
 - ✓ une augmentation du contenu adipeux médullaire dans le groupe OVX_PF
 - ✓ une localisation du contenu adipeux éloignée de la surface osseuse trabéculaire.
- Dans le condyle :
 - ✓ une absence de variation du volume osseux ainsi que du volume de moelle osseuse.
 - ✓ une densité trabéculaire inférieure associée à une épaisseur des travées, un indice de fragmentation trabéculaire supérieur.
 - ✓ Une **apparition tardive du contenu adipeux**.

Dans les groupes OVX, une **corrélation négative entre le volume d'adiposité médullaire et l'épaisseur des travées** est rapportée uniquement dans le tibia, suggérant une implication de l'adiposité médullaire dans le métabolisme osseux local.

L'ovariectomie se caractérise par des modifications ostéo-médullaires et adipocytaires marquées dans le tibia et plus discrète en site mandibulaire. Dans la mandibule, on peut émettre l'hypothèse que l'activité masticatoire limite la conversion adipeuse médullaire et la perte osseuse.

Ce travail de thèse montre une relation de la distribution adipocytaire sur la microarchitecture osseuse dans le tibia et pas dans la mandibule. Cela ouvre des perspectives pour de futures études visant à préciser l'impact de cette distribution sur la qualité osseuse à l'échelle moléculaire. Ainsi, nous avons initiés des travaux préliminaires sur la composition ultrastructurale osseuse et le degré de minéralisation tissulaire en fonction de l'âge tissulaire au sein de la mandibule (Fig. 35-36).

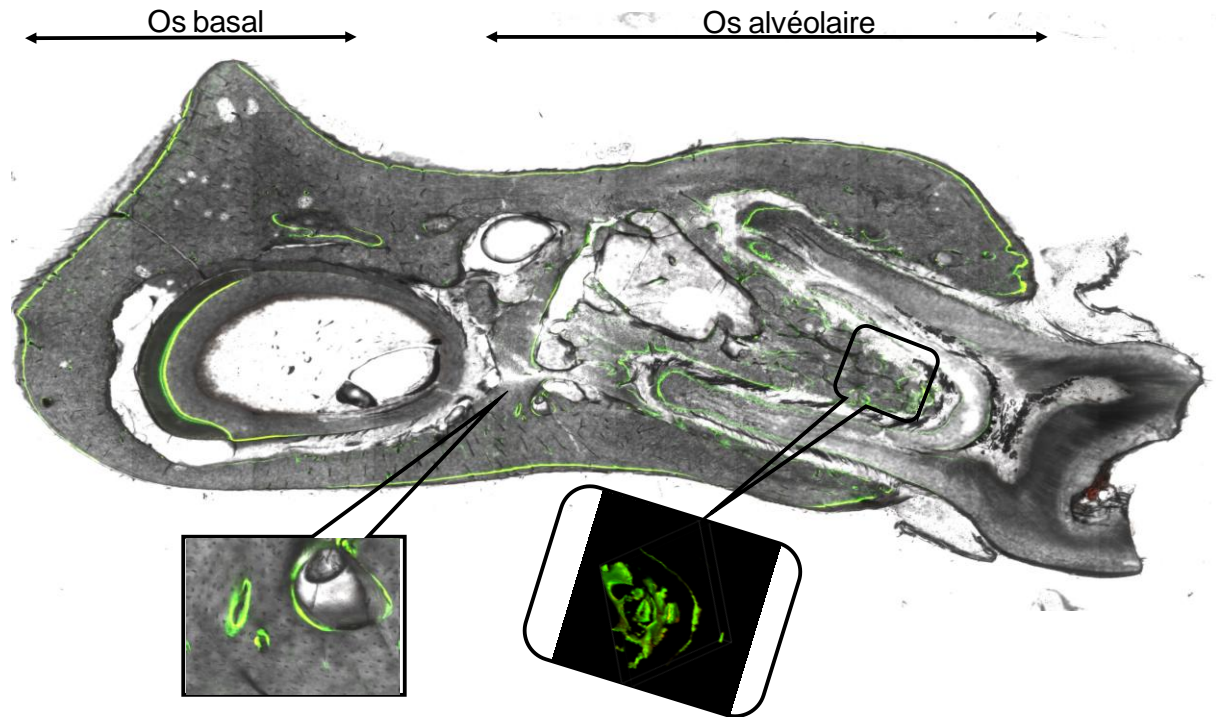


Figure 35 : Coupe frontale de tissu osseux mandibulaire de rat observée en microscopie à balayage laser révélant la co-localisation des sondes fluorescentes injectées avant sacrifice de l'animal (calceïne, vert J-15; déméclocycline ; jaune J-1) : technique de double-marquage par les tétracyclines. Chaque marque fluorescente révèle le front de minéralisation actif au moment où la dose a été administrée (travail personnel).

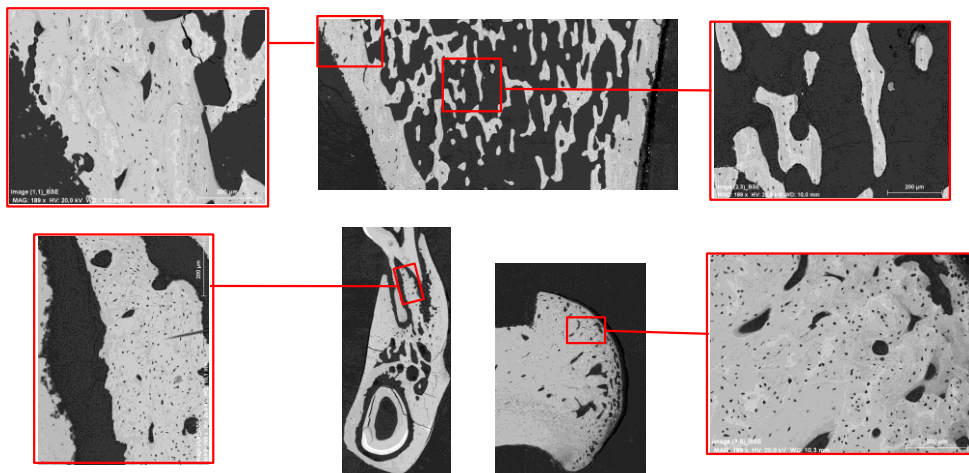


Figure 36 : Images MEB de tissu osseux (tibia, os alvéolaire et condyle), montrant l'hétérogénéité de la minéralisation inter-site corticale et spongieuse (x400). Les faibles niveaux de gris reflètent un faible degré de minéralisation et inversement.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Manolagas SC, Jilka RL. Bone Marrow, Cytokines, and Bone Remodeling — Emerging Insights into the Pathophysiology of Osteoporosis. *N Engl J Med*. 1995 Feb 2;332(5):305–11.
2. Rachner TD, Khosla S, Hofbauer LC. Osteoporosis: now and the future. *The Lancet*. 2011 Apr 15;377(9773):1276–87.
3. Black DM, Rosen CJ. Postmenopausal Osteoporosis. *N Engl J Med*. 2016;374(3):254–62.
4. Wade SW, Strader C, Fitzpatrick LA, Anthony MS, O'Malley CD. Estimating prevalence of osteoporosis: examples from industrialized countries. *Arch Osteoporos*. 2014 Dec 1;9(1):1–10.
5. Svedbom A, Hernlund E, Ivergård M, Compston J, Cooper C, Stenmark J, et al. Osteoporosis in the European Union: a compendium of country-specific reports. *Arch Osteoporos*. 2013 Oct 11;8(1–2):1–218.
6. Jilka RL. Biology of the basic multicellular unit and the pathophysiology of osteoporosis. *Med Pediatr Oncol*. 2003 Sep 1;41(3):182–5.
7. McGrath C, Bedi R. The importance of oral health to older people's quality of life. *Gerodontology*. 1999 Jul 1;16(1):59–63.
8. Kanis JA, Melton LJ, Christiansen C, Johnston CC, Khaltaev N. The diagnosis of osteoporosis. *J Bone Miner Res*. 1994 Aug 1;9(8):1137–41.
9. The Epidemiology and Quality of Life Working Group of IOF, Kanis JA, Adachi JD, Cooper C, Clark P, Cummings SR, et al. Standardising the descriptive epidemiology of osteoporosis: recommendations from the Epidemiology and Quality of Life Working Group of IOF. *Osteoporos Int*. 2013 Nov;24(11):2763–4.
10. Lems WF, Raterman HG. Critical issues and current challenges in osteoporosis and fracture prevention. An overview of unmet needs. *Ther Adv Musculoskelet Dis*. 2017 Dec;9(12):299–316.
11. Paccou J, Hardouin P, Cotten A, Penel G, Cortet B. The Role of Bone Marrow Fat in Skeletal Health: Usefulness and Perspectives for Clinicians. *J Clin Endocrinol Metab*. 2015;100(10):3613–21.
12. Legrand E, Degasne I, Audran M, Chappard D, Basle M-F. Ostéoporoses. [cited 2016 Dec 5]; Available from: <http://www.em-premium.com/article/8150/resultatrecherche/51>
13. Schnitzler CM, Mesquita J. Bone Marrow Composition and Bone Microarchitecture and Turnover in Blacks and Whites. *J Bone Miner Res*. 1998;13(8):1300–7.

14. Scheller EL, Rosen CJ. What's the matter with MAT? Marrow adipose tissue, metabolism, and skeletal health. *Ann N Y Acad Sci.* 2014;1311(1):14–30.
15. Kawai M, de Paula FJA, Rosen CJ. New insights into osteoporosis: the bone–fat connection. *J Intern Med.* 2012;272(4):317–29.
16. Hardouin P, Marie PJ, Rosen CJ. New insights into bone marrow adipocytes: Report from the First European Meeting on Bone Marrow Adiposity (BMA 2015). *Bone.* 2016;93:212–5.
17. Li Z, Hardij J, Bagchi DP, Scheller EL, MacDougald OA. Development, regulation, metabolism and function of bone marrow adipose tissues. *Bone.* 2018 May;110:134–40.
18. Ambrosi TH, Schulz TJ. The emerging role of bone marrow adipose tissue in bone health and dysfunction. *J Mol Med.* 2017 Dec;95(12):1291–301.
19. Guiglia R, Di Fede O, Lo Russo L, Sprini D, Rini G-B, Campisi G. Osteoporosis, jawbones and periodontal disease. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2013 Jan;18(1):e93-99.
20. Jeffcoat MK, Lewis CE, Reddy MS, Wang C-Y, Redford M. Post-menopausal bone loss and its relationship to oral bone loss. *Periodontol 2000.* 2000 Jun 1;23(1):94–102.
21. Jeffcoat M. The Association Between Osteoporosis and Oral Bone Loss. *J Periodontol.* 2005 Nov;76(11-s):2125–32.
22. Devlin H, Karayianni K, Mitsea A, Jacobs R, Lindh C, Stelt P van der, et al. Diagnosing osteoporosis by using dental panoramic radiographs: The OSTEODENT project. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2007 Dec 1;104(6):821–8.
23. Karayianni K, Horner K, Mitsea A, Berkas L, Mastoris M, Jacobs R, et al. Accuracy in osteoporosis diagnosis of a combination of mandibular cortical width measurement on dental panoramic radiographs and a clinical risk index (OSIRIS): The OSTEODENT project. *Bone.* 2007 Jan 1;40(1):223–9.
24. Nicopoulou-Karayianni K, Tzoutzoukos P, Mitsea A, Karayiannis A, Tsiklakis K, Jacobs R, et al. Tooth loss and osteoporosis: the osteodent study. *J Clin Periodontol.* 2009 Mar 1;36(3):190–7.
25. Bodic F, Hamel L, Lerouxel E, Baslé MF, Chappard D. Bone loss and teeth. *Joint Bone Spine.* 2005;72(3):215–21.
26. Bouxsein ML. Bone quality: where do we go from here? *Osteoporos Int.* 2003;14(5):118–27.
27. Bryon P-A. Anatomie et histologie de la moelle osseuse. [cited 2017 Jan 10]; Available from: <http://www.em-premium.com/article/781/resultatrecherche/1>

28. Morrison SJ, Scadden DT. The bone marrow niche for haematopoietic stem cells. *Nature*. 2014;505(7483):327–34.
29. Currey JD. The many adaptations of bone. *J Biomech*. 2003;36(10):1487–95.
30. Fleischmannova J, Matalova E, Sharpe PT, Misesk I, Radlanski RJ. Formation of the Tooth-Bone Interface. *J Dent Res*. 2010;89(2):108–15.
31. Saffar J-L, Lasfargues J-J, Cherruau M. Alveolar bone and the alveolar process: the socket that is never stable. *Periodontol 2000*. 1997;13(1):76–90.
32. Naveh GRS, Lev-Tov Chattah N, Zaslansky P, Shahar R, Weiner S. Tooth–PDL–bone complex: Response to compressive loads encountered during mastication – A review. *Arch Oral Biol*. 2012;57(12):1575–84.
33. Grandfield K, Herber R-P, Chen L, Djomehri S, Tam C, Lee J-H, et al. Strain-guided mineralization in the bone–PDL–cementum complex of a rat periodontium. *Bone Rep*. 2015;3:20–31.
34. von Wowern N. Variations in structure within the trabecular bone of the mandible. *Scand J Dent Res*. 1977 Nov;85(7):613–22.
35. An S-Y, Lee Y-J, Neupane S, Jun J-H, Kim J-Y, Lee Y, et al. Effects of vascular formation during alveolar bone process morphogenesis in mice. *Histochem Cell Biol*. 2017;1–9.
36. Bresin A, Kiliaridis S, Strid K-G. Effect of masticatory function on the internal bone structure in the mandible of the growing rat. *Eur J Oral Sci*. 1999 Feb 1;107(1):35–44.
37. Mavropoulos A, Ödman A, Ammann P, Kiliaridis S. Rehabilitation of masticatory function improves the alveolar bone architecture of the mandible in adult rats. *Bone*. 2010 Sep;47(3):687–92.
38. Liu J, Jin Z, Li Q. Effect of occlusal hypofunction and its recovery on the three-dimensional architecture of mandibular alveolar bone in growing rats. *J Surg Res*. 2015 Jan;193(1):229–36.
39. An J, Li Y, Liu Z, Wang R, Zhang B. A micro-CT study of microstructure change of alveolar bone during orthodontic tooth movement under different force magnitudes in rats. *Exp Ther Med*. 2017;13(5):1793–8.
40. Milne TJ, Ichim I, Patel B, McNaughton A, Meikle MC. Induction of osteopenia during experimental tooth movement in the rat: alveolar bone remodelling and the mechanostat theory. *Eur J Orthod*. 2009 Jun 1;31(3):221–31.
41. Dai Q, Zhou S, Zhang P, Ma X, Ha N, Yang X, et al. Force-induced increased osteogenesis enables accelerated orthodontic tooth movement in ovariectomized rats. *Sci Rep*. 2017 Jun 20;7(1):3906.
42. von Wowern N, Hjørting-Hansen E, Stoltze K. Changes in bone mass in rat mandibles after tooth extraction. *Int J Oral Surg*. 1979 Jun;8(3):229–33.

43. Devlin H, Ferguson MW. Alveolar ridge resorption and mandibular atrophy. A review of the role of local and systemic factors. *Br Dent J*. 1991 Feb 9;170(3):101–4.
44. Allen MR. The effects of bisphosphonates on jaw bone remodeling, tissue properties, and extraction healing. *Odontology*. 2011 Jan;99(1):8–17.
45. Huja SS, Fernandez SA, Hill KJ, Li Y. Remodeling dynamics in the Alveolar Process in Skeletally Mature Dogs. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol*. 2006 Dec;288(12):1243–9.
46. Huja SS, Mason A, Fenell CE, Mo X, Hueni S, D'Atri AM, et al. Effects of Short-Term Zoledronic Acid Treatment on Bone Remodeling and Healing at Surgical Sites in the Maxilla and Mandible of Aged Dogs. *J Oral Maxillofac Surg*. 2011 Feb;69(2):418–27.
47. Kingsmill VJ. Post-Extraction Remodeling of the Adult Mandible. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1999 Jun;10(3):384–404.
48. Chai Y, Maxson RE. Recent advances in craniofacial morphogenesis. *Dev Dyn*. 2006 Sep 1;235(9):2353–75.
49. Helms JA, Schneider RA. Cranial skeletal biology. *Nature*. 2003 May;423(6937):326–31.
50. Leucht P, Kim J-B, Amasha R, James AW, Girod S, Helms JA. Embryonic origin and Hox status determine progenitor cell fate during adult bone regeneration. *Development*. 2008 Sep 1;135(17):2845–54.
51. Creuzet S, Couly G, Vincent C, Le Douarin NM. Negative effect of Hox gene expression on the development of the neural crest-derived facial skeleton. *Dev Camb Engl*. 2002 Sep;129(18):4301–13.
52. Grammatopoulos GA, Bell E, Toole L, Lumsden A, Tucker AS. Homeotic transformation of branchial arch identity after *Hoxa2* overexpression. *Dev Camb Engl*. 2000 Dec;127(24):5355–65.
53. Cohn MJ. Erratum: Lamprey Hox genes and the origin of jaws: Evolutionary biology. *Nature*. 2002 Mar;416(6879):386–7.
54. Kingsmill VJ, McKay IJ, Ryan P, Ogden MR, Rawlinson SCF. Gene expression profiles of mandible reveal features of both calvarial and ulnar bones in the adult rat. *J Dent*. 2013 Mar;41(3):258–64.
55. Rawlinson SCF, McKay IJ, Ghuman M, Wellmann C, Ryan P, Prajaneh S, et al. Adult Rat Bones Maintain Distinct Regionalized Expression of Markers Associated with Their Development. *PLoS ONE*. 2009 Dec 21;4(12):e8358.
56. Zohrabian VM, Poon CS, Abrahams JJ. Embryology and Anatomy of the Jaw and Dentition. *Semin Ultrasound CT MRI*. 2015 Oct 1;36(5):397–406.

57. Jacques J, Hotton D, De la Dure-Molla M, Petit S, Asselin A, Kulkarni AB, et al. Tracking Endogenous Amelogenin and Ameloblastin In Vivo. *PLoS ONE*. 2014;9(6):e99626.
58. Jacques J, Hotton D, Asselin A, De la Dure-Molla M, Coudert AE, Isaac J, et al. Ameloblastin as a putative marker of specific bone compartments. *Connect Tissue Res*. 2014;55(S1):117–20.
59. Roux J-P, Wegrzyn J, Arlot ME, Guyen O, Delmas PD, Chapurlat R, et al. Contribution of Trabecular and Cortical Components to Biomechanical Behavior of Human Vertebrae: An Ex Vivo Study. *J Bone Miner Res*. 2010;25(2):356–61.
60. Rho JY, Kuhn-Spearing L, Zioupos P. Mechanical properties and the hierarchical structure of bone. *Med Eng Phys*. 1998 Mar;20(2):92–102.
61. Goodyear SR, Gibson IR, Skakle JMS, Wells RPK, Aspden RM. A comparison of cortical and trabecular bone from C57 Black 6 mice using Raman spectroscopy. *Bone*. 2009 May;44(5):899–907.
62. Chappard D, Baslé MF, Legrand E, Audran M. New laboratory tools in the assessment of bone quality. *Osteoporos Int*. 2011 Aug;22(8):2225–40.
63. Hardouin P, Pansini V, Cortet B. Bone marrow fat. *Joint Bone Spine*. 2014;81(4):313–9.
64. Paccou J, Penel G, Chauveau C, Cortet B, Hardouin P. Marrow adiposity and bone: Review of clinical implications. *Bone* [Internet]. 2018 Mar [cited 2018 Apr 16];
65. Gimble JM, Robinson CE, Wu X, Kelly KA. The function of adipocytes in the bone marrow stroma: an update. *Bone*. 1996 Nov;19(5):421–8.
66. Matsubara T, Suardita K, Ishii M, Sugiyama M, Igarashi A, Oda R, et al. Alveolar Bone Marrow as a Cell Source for Regenerative Medicine: Differences Between Alveolar and Iliac Bone Marrow Stromal Cells. *J Bone Miner Res*. 2004 Nov 29;20(3):399–409.
67. Yamaza T, Ren G, Akiyama K, Chen C, Shi Y, Shi S. Mouse Mandible Contains Distinctive Mesenchymal Stem Cells. *J Dent Res*. 2011;90(3):317–24.
68. Akintoye SO, Lam T, Shi S, Brahim J, Collins MT, Robey PG. Skeletal site-specific characterization of orofacial and iliac crest human bone marrow stromal cells in same individuals. *Bone*. 2006;38(6):758–68.
69. Matsubara T, Suardita K, Ishii M, Sugiyama M, Igarashi A, Oda R, et al. Alveolar Bone Marrow as a Cell Source for Regenerative Medicine: Differences Between Alveolar and Iliac Bone Marrow Stromal Cells. *J Bone Miner Res*. 2005 Mar 1;20(3):399–409.
70. Aghaloo T I., Chaichanasakul T, Bezouglaia O, Kang B, Franco R, Dry S m., et al. Osteogenic Potential of Mandibular vs. Long-bone Marrow Stromal Cells. *J Dent Res*. 2010 Nov;89(11):1293.

71. Fairfield H, Rosen CJ, Reagan MR. Connecting Bone and Fat: the Potential Role for Sclerostin. *Curr Mol Biol Rep*. 2017;3(2):114–21.
72. Fairfield H, Falank C, Harris E, Demambro V, McDonald M, Pettitt JA, et al. The skeletal cell-derived molecule sclerostin drives bone marrow adipogenesis. *J Cell Physiol*. 2018 Feb;233(2):1156–67.
73. Hernandez CJ, Majeska RJ, Schaffler MB. Osteocyte density in woven bone. *Bone*. 2004 Nov;35(5):1095–9.
74. Qiu S, Rao D., Palnitkar S, Parfitt A. Relationships between osteocyte density and bone formation rate in human cancellous bone. *Bone*. 2002 Dec;31(6):709–11.
75. Liu M, Kurimoto P, Zhang J, Niu QT, Stolina M, Dechow PC, et al. Sclerostin and DKK1 Inhibition Preserves and Augments Alveolar Bone Volume and Architecture in Rats with Alveolar Bone Loss. *J Dent Res*. 2018 Apr 4;002203451876687.
76. Pu Y, Wu H, Lu S, Hu H, Li D, Wu Y, et al. Adiponectin Promotes Human Jaw Bone Marrow Stem Cell Osteogenesis. *J Dent Res*. 2016 Jul;95(7):769–75.
77. Craft CS, Scheller EL. Evolution of the Marrow Adipose Tissue Microenvironment. *Calcif Tissue Int*. 2016;1–15.
78. Scheller EL, Burr AA, MacDougald OA, Cawthorn WP. Inside out: Bone marrow adipose tissue as a source of circulating adiponectin. *Adipocyte*. 2016;5(3):251–69.
79. Stockman R, Greig EDW. The Action of Arsenic on the Bone-Marrow and Blood. *J Physiol*. 1898 Dec 30;23(5):376–82.
80. Gordon MY, King JA, Gordon-Smith EC. Bone marrow fibroblasts, fat cells and colony-stimulating activity. *Br J Haematol*. 1980 Sep;46(1):151–2.
81. Burkhardt R, Kettner G, Böhm W, Schmidmeier M, Schlag R, Frisch B, et al. Changes in trabecular bone, hematopoiesis and bone marrow vessels in aplastic anemia, primary osteoporosis, and old age: a comparative histomorphometric study. *Bone*. 1987;8(3):157–64.
82. Martin RB, Chow BD, Lucas PA. Bone marrow fat content in relation to bone remodeling and serum chemistry in intact and ovariectomized dogs. *Calcif Tissue Int*. 1990;46(3):189–94.
83. Lanske B, Rosen C. Bone Marrow Adipose Tissue: The First 40 Years. *J Bone Miner Res*. 2017;32(6):1153–6.
84. Gimble JM, Zvonic S, Floyd ZE, Kassem M, Nuttall ME. Playing with bone and fat. *J Cell Biochem*. 2006;98(2):251–66.
85. Bukowska J, Frazier T, Smith S, Brown T, Bender R, McCarthy M, et al. Bone Marrow Adipocyte Developmental Origin and Biology. *Curr Osteoporos Rep*

- [Internet]. 2018 Apr 18 [cited 2018 Apr 20]; Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s11914-018-0442-z>
86. Maniatis A, Tavassoli M, Crosby WH. Factors Affecting the Conversion of Yellow to Red Marrow. *Blood*. 1971 May 1;37(5):581–6.
 87. Meunier P, Aaron J, Edouard C, Vignon G. Osteoporosis and the replacement of cell populations of the marrow by adipose tissue. A quantitative study of 84 iliac bone biopsies. *Clin Orthop*. 1971;80:147–54.
 88. Justesen J, Stenderup K, Ebbesen EN, Mosekilde L, Steiniche T, Kassem M. Adipocyte tissue volume in bone marrow is increased with aging and in patients with osteoporosis. *Biogerontology*. 2001;2(3):165–71.
 89. Ricci C, Cova M, Kang YS, Yang A, Rahmouni A, Scott WW, et al. Normal age-related patterns of cellular and fatty bone marrow distribution in the axial skeleton: MR imaging study. *Radiology*. 1990 Oct 1;177(1):83–8.
 90. Justesen J, Stenderup K, Eriksen EF, Kassem M. Maintenance of Osteoblastic and Adipocytic Differentiation Potential with Age and Osteoporosis in Human Marrow Stromal Cell Cultures. *Calcif Tissue Int*. 2002;71(1):36–44.
 91. Griffith JF, Yeung DKW, Ma HT, Leung JCS, Kwok TCY, Leung PC. Bone marrow fat content in the elderly: A reversal of sex difference seen in younger subjects. *J Magn Reson Imaging*. 2012 Jul 1;36(1):225–30.
 92. Di Iorgi N, Rosol M, Mittelman SD, Gilsanz V. Reciprocal Relation between Marrow Adiposity and the Amount of Bone in the Axial and Appendicular Skeleton of Young Adults. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008 Jun;93(6):2281–6.
 93. Shen W, Velasquez G, Chen J, Jin Y, Heymsfield SB, Gallagher D, et al. Comparison of the Relationship Between Bone Marrow Adipose Tissue and Volumetric Bone Mineral Density in Children and Adults. *J Clin Densitom*. 2014;17(1):163–9.
 94. Reske SN. Recent advances in bone marrow scanning. *Eur J Nucl Med*. 1991;18(3):203–21.
 95. Karampinos DC, Ruschke S, Dieckmeyer M, Diefenbach M, Franz D, Gersing AS, et al. Quantitative MRI and spectroscopy of bone marrow: Quantitative MR of Bone Marrow. *J Magn Reson Imaging*. 2018 Feb;47(2):332–53.
 96. Scheller EL, Doucette CR, Learman BS, Cawthorn WP, Khandaker S, Schell B, et al. Region-specific variation in the properties of skeletal adipocytes reveals regulated and constitutive marrow adipose tissues. *Nat Commun*. 2015;6:7808.
 97. Spalding KL, Arner E, Westermark PO, Bernard S, Buchholz BA, Bergmann O, et al. Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature*. 2008 Jun 5;453(7196):783–7.
 98. Kassem M, Abdallah BM, Saeed H. Osteoblastic cells: Differentiation and trans-differentiation. *Arch Biochem Biophys*. 2008;473(2):183–7.

99. Abdallah BM, Kassem M. New factors controlling the balance between osteoblastogenesis and adipogenesis. *Bone*. 2012 Feb 1;50(2):540–5.
100. Manceron V, Guignard S, de Broucker F, Paycha F, Pouchot J, Vinceneux P. Le phénomène de reconversion médullaire et son aspect en imagerie par résonance magnétique : à propos d'un cas. *Rev Médecine Interne*. 2003 Dec;24(12):830–4.
101. Nuttall M. Controlling the balance between osteoblastogenesis and adipogenesis and the consequent therapeutic implications. *Curr Opin Pharmacol*. 2004 Jun;4(3):290–4.
102. Emery JL, Follett GF. Regression of bone-marrow haematopoiesis from the terminal digits in the foetus and infant. *Br J Haematol*. 1964 Oct;10:485–9.
103. Yamada M, Matsuzaka T, Uetani M, Hayashi K, Tsuji Y, Nakamura T. Normal age-related conversion of bone marrow in the mandible: MR imaging findings. *Am J Roentgenol*. 1995 Nov 1;165(5):1223–8.
104. Lips P, van Ginkel FC, Netelenbos JC. Bone marrow and bone remodeling. *Bone*. 1985;6(5):343–4.
105. Rozman C, Feliu E, Berga L, Reverter JC, Climent C, Ferrán MJ. Age-related variations of fat tissue fraction in normal human bone marrow depend both on size and number of adipocytes: a stereological study. *Exp Hematol*. 1989;17(1):34–7.
106. Kajkenova O, Lecka-Czernik B, Gubrij I, Hauser SP, Takahashi K, Parfitt AM, et al. Increased Adipogenesis and Myelopoiesis in the Bone Marrow of SAMP6, a Murine Model of Defective Osteoblastogenesis and Low Turnover Osteopenia. *J Bone Miner Res*. 1997;12(11):1772–9.
107. Abella E, Feliu E, Granada I, Millá F, Oriol A, Ribera JM, et al. Bone Marrow Changes in Anorexia Nervosa Are Correlated With the Amount of Weight Loss and Not With Other Clinical Findings. *Am J Clin Pathol*. 2002 Oct 1;118:582–8.
108. Menagh PJ, Turner RT, Jump DB, Wong CP, Lowry MB, Yakar S, et al. Growth hormone regulates the balance between bone formation and bone marrow adiposity. *J Bone Miner Res*. 2010;25(4):757–68.
109. Elias EJ, Liao JH, Jara H, Watanabe M, Nadgir RN, Sakai Y, et al. Quantitative MRI Analysis of Craniofacial Bone Marrow in Patients with Sickle Cell Disease. *Am J Neuroradiol*. 2013 Jan 3;34(3):622–7.
110. Tavassoli M. Ultrastructural development of bone marrow adipose cell. *Acta Anat (Basel)*. 1976;94(1):65–77.
111. Eerden B van der, Wijnen A van. Meeting report of the 2016 bone marrow adiposity meeting. *Adipocyte*. 2017;0(0):1–10.

112. Poloni A, Maurizi G, Serrani F, Mancini S, Zingaretti MC, Frontini A, et al. Molecular and functional characterization of human bone marrow adipocytes. *Exp Hematol*. 2013 Jun;41(6):558-566.e2.
113. During A, Penel G, Hardouin P. Understanding the local actions of lipids in bone physiology. *Prog Lipid Res*. 2015;59:126–46.
114. Gillet C, Rasschaert J. Phenotype of Bone Marrow Adipose Tissue: Specificities of the Anatomical Distribution, Secretory Profile, Lipid Content, and Response to Nutritional Status. *Curr Mol Biol Rep*. 2018 Mar;4(1):8–15.
115. Gimble JM. Leptin's balancing act between bone and fat. *J Bone Miner Res*. 2011 Aug 1;26(8):1694–7.
116. Evans BAJ, Bull MJ, Kench RC, Fox RE, Morgan LD, Stevenson AE, et al. The influence of leptin on trabecular architecture and marrow adiposity in GH-deficient rats. *J Endocrinol*. 2011 Jan 1;208(1):69–79.
117. Muruganandan S, Roman AA, Sinal CJ. Role of chemerin/CMKLR1 signaling in adipogenesis and osteoblastogenesis of bone marrow stem cells. *J Bone Miner Res*. 2010 Feb;25(2):222–34.
118. Sadie-Van Gijzen H, Crowther NJ, Hough FS, Ferris WF. The interrelationship between bone and fat: from cellular see-saw to endocrine reciprocity. *Cell Mol Life Sci*. 2013 Jul;70(13):2331–49.
119. Hardouin P, Rharass T, Lucas S. Bone Marrow Adipose Tissue: To Be or Not To Be a Typical Adipose Tissue? *Front Endocrinol [Internet]*. 2016 [cited 2017 Mar 16];7. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fendo.2016.00085/abstract>
120. Liu XL, Li CL, Lu WW, Cai WX, Zheng LW. Skeletal site-specific response to ovariectomy in a rat model: change in bone density and microarchitecture. *Clin Oral Implants Res*. 2014 Mar 1;n/a-n/a.
121. Scheller EL, Cawthorn WP, Burr AA, Horowitz MC, MacDougald OA. Marrow Adipose Tissue: Trimming the Fat. *Trends Endocrinol Metab*. 2016 Jun;27(6):392–403.
122. Yeung DKW, Griffith JF, Antonio GE, Lee FKH, Woo J, Leung PC. Osteoporosis is associated with increased marrow fat content and decreased marrow fat unsaturation: A proton MR spectroscopy study. *J Magn Reson Imaging*. 2005 Aug 1;22(2):279–85.
123. Scheller EL, Khoury B, Moller KL, Wee NKY, Khandaker S, Kozloff KM, et al. Changes in Skeletal Integrity and Marrow Adiposity during High-Fat Diet and after Weight Loss. *Front Endocrinol [Internet]*. 2016 [cited 2016 Nov 22];7. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fendo.2016.00102/abstract>
124. Doherty AH, Roteliuk DM, Gookin SE, McGrew AK, Broccardo CJ, Condon KW, et al. Exploring the Bone Proteome to Help Explain Altered Bone

- Remodeling and Preservation of Bone Architecture and Strength in Hibernating Marmots. *Physiol Biochem Zool.* 2016 Sep;89(5):364–76.
125. Fan Y, Hanai J, Le PT, Bi R, Maridas D, DeMambro V, et al. Parathyroid Hormone Directs Bone Marrow Mesenchymal Cell Fate. *Cell Metab.* 2017;25(3):661–72.
126. Portal-Núñez S, Mediero A, Esbrit P, Sánchez-Pernaute O, Largo R, Herrero-Beaumont G. Unexpected Bone Formation Produced by RANKL Blockade. *Trends Endocrinol Metab.* 2017 Oct;28(10):695–704.
127. Martin TJ, Seeman E. Bone remodelling: its local regulation and the emergence of bone fragility. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2008 Oct 1;22(5):701–22.
128. Lecka-Czernik B. Marrow fat metabolism is linked to the systemic energy metabolism. *Bone.* 2012 Feb;50(2):534–9.
129. Cawthorn WP, Scheller EL, Learman BS, Parlee SD, Simon BR, Mori H, et al. Bone Marrow Adipose Tissue Is an Endocrine Organ that Contributes to Increased Circulating Adiponectin during Caloric Restriction. *Cell Metab.* 2014;20(2):368–75.
130. Sulston RJ, Cawthorn WP. Bone marrow adipose tissue as an endocrine organ: close to the bone? *Horm Mol Biol Clin Investig* [Internet]. 2016 Jan 1
131. Yue R, Zhou BO, Shimada IS, Zhao Z, Morrison SJ. Leptin Receptor Promotes Adipogenesis and Reduces Osteogenesis by Regulating Mesenchymal Stromal Cells in Adult Bone Marrow. *Cell Stem Cell.* 2016 Jun 2;18(6):782–96.
132. Kozloff KM, Volakis LI, Marini JC, Caird MS. Near-infrared fluorescent probe traces bisphosphonate delivery and retention in vivo. *J Bone Miner Res.* 2010 Aug 1;25(8):1748–58.
133. Lucas S, Clabaut A, Ghali O, Haren N, Hardouin P, Broux O. Implication of fatty acids in the inhibitory effect of human adipocytes on osteoblastic differentiation. *Bone.* 2013;55(2):429–30.
134. Schwartz AV. Marrow fat and bone: review of clinical findings. *Bone Res.* 2015;6:40.
135. Patsch JM, Li X, Baum T, Yap SP, Karampinos DC, Schwartz AV, et al. Bone marrow fat composition as a novel imaging biomarker in postmenopausal women with prevalent fragility fractures. *J Bone Miner Res.* 2013 Aug 1;28(8):1721–8.
136. Devlin MJ. Bone marrow composition, diabetes, and fracture risk: More bad news for saturated fat. *J Bone Miner Res.* 2013 Aug 1;28(8):1718–20.
137. Pino AM, Miranda M, Figueroa C, Rodríguez JP, Rosen CJ. Qualitative Aspects of Bone Marrow Adiposity in Osteoporosis. *Front Endocrinol.* 2016

138. Mödder UI, Khosla S. Skeletal stem/osteoprogenitor cells: Current concepts, alternate hypotheses, and relationship to the bone remodeling compartment. *J Cell Biochem.* 2008 Feb 1;103(2):393–400.
139. Clabaut A, Delplace S, Chauveau C, Hardouin P, Broux O. Human osteoblasts derived from mesenchymal stem cells express adipogenic markers upon coculture with bone marrow adipocytes. *Differentiation.* 2010;80(1):40–5.
140. Li M, Shen Y, Qi H, Wronski TJ. Comparative study of skeletal response to estrogen depletion at red and yellow marrow sites in rats. *Anat Rec.* 1996 Jul;245(3):472–80.
141. Ucer S, Iyer S, Kim H-N, Han L, Rutlen C, Allison K, et al. The Effects of Aging and Sex Steroid Deficiency on the Murine Skeleton Are Independent and Mechanistically Distinct. *J Bone Miner Res.* 2017 Mar 1;32(3):560–74.
142. Marie PJ, Kassem M. Extrinsic Mechanisms Involved in Age-Related Defective Bone Formation. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011 Mar;96(3):600–9.
143. Garnero P, Sornay-Rendu E, Chapuy M-C, Delmas PD. Increased bone turnover in late postmenopausal women is a major determinant of osteoporosis. *J Bone Miner Res.* 1996;11(3):337–49.
144. Lerner UH. Bone Remodeling in Post-menopausal Osteoporosis. *J Dent Res.* 2006 Jul 1;85(7):584–95.
145. Seeman E. Age- and Menopause-Related Bone Loss Compromise Cortical and Trabecular Microstructure. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2013 Jan 10;68(10):1218–25.
146. Trudel G, Payne M, Mädler B, Ramachandran N, Lecompte M, Wade C, et al. Bone marrow fat accumulation after 60 days of bed rest persisted 1 year after activities were resumed along with hemopoietic stimulation: the Women International Space Simulation for Exploration study. *J Appl Physiol.* 2009 Aug 1;107(2):540–8.
147. Gillet C, Dalla Valle A, Gaspard N, Spruyt D, Vertongen P, Lechanteur J, et al. Osteonecrosis of the Femoral Head: Lipotoxicity Exacerbation in MSC and Modifications of the Bone Marrow Fluid. *Endocrinology.* 2017 Mar 1;158(3):490–502.
148. Verma S, Rajaratnam JH, Denton J, Hoyland JA, Byers RJ. Adipocytic proportion of bone marrow is inversely related to bone formation in osteoporosis. *J Clin Pathol.* 2002;55(9):693–8.
149. Rosen CJ, Klibanski A. Bone, Fat, and Body Composition: Evolving Concepts in the Pathogenesis of Osteoporosis. *Am J Med.* 2009;122(5):409–14.
150. Bredella MA, Fazeli PK, Miller KK, Misra M, Torriani M, Thomas BJ, et al. Increased Bone Marrow Fat in Anorexia Nervosa. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009;94(6):2129–36.

151. Bredella MA, Fazeli PK, Daley SM, Miller KK, Rosen CJ, Klibanski A, et al. Marrow fat composition in anorexia nervosa. *Bone*. 2014;66:199–204.
152. Naveiras O, Nardi V, Wenzel PL, Hauschka PV, Fahey F, Daley GQ. Bone-marrow adipocytes as negative regulators of the haematopoietic microenvironment. *Nature*. 2009 Jul 9;460(7252):259–63.
153. Morris EV, Edwards CM. Bone Marrow Adipose Tissue: A New Player in Cancer Metastasis to Bone. *Front Endocrinol*. 2016
154. Falank C, Fairfield H, Reagan MR. Signaling Interplay between Bone Marrow Adipose Tissue and Multiple Myeloma cells. *Front Endocrinol*. 2016.
155. Kurabayashi T, Tomita M, Matsushita H, Honda A, Takakuwa K, Tanaka K. Effects of a β 3 Adrenergic Receptor Agonist on Bone and Bone Marrow Adipocytes in the Tibia and Lumbar Spine of the Ovariectomized Rat. *Calcif Tissue Int*. 2001 Apr;68(4):248–54.
156. Devlin MJ, Cloutier AM, Thomas NA, Panus DA, Lotinun S, Pinz I, et al. Caloric restriction leads to high marrow adiposity and low bone mass in growing mice. *J Bone Miner Res*. 2010;25(9):2078–88.
157. Li G-W, Xu Z, Chen Q-W, Chang S-X, Tian Y-N, Fan J-Z. The temporal characterization of marrow lipids and adipocytes in a rabbit model of glucocorticoid-induced osteoporosis. *Skeletal Radiol*. 2013 Sep;42(9):1235–44.
158. Reid IR. Obesity and osteoporosis. 2006;
159. Watkins BA, Li Y, Seifert MF. Lipids as modulators of bone remodelling. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2001 Mar;4(2):105–10.
160. Li Y, Greiner RS, Salem N, Watkins BA. Impact of dietary n-3 FA deficiency on rat bone tissue FA composition. *Lipids*. 2003;38(6):683–6.
161. Elbaz A, Wu X, Rivas D, Gimble JM, Duque G. Inhibition of fatty acid biosynthesis prevents adipocyte lipotoxicity on human osteoblasts in vitro. *J Cell Mol Med*. 2010 Apr;14(4):982–91.
162. Corwin RL, Hartman TJ, Maczuga SA, Graubard BI. Dietary Saturated Fat Intake Is Inversely Associated with Bone Density in Humans: Analysis of NHANES III. *J Nutr*. 2006 Jan 1;136(1):159–65.
163. Li X, Shet K, Xu K, Rodríguez JP, Pino AM, Kurhanewicz J, et al. Unsaturation level decreased in bone marrow fat of postmenopausal women with low bone density using high resolution magic angle spinning (HRMAS) ^1H NMR spectroscopy. *Bone*. 2017 Dec;105:87–92.
164. Poulsen RC, Moughan PJ, Kruger MC. Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acids and the Regulation of Bone Metabolism. *Exp Biol Med*. 2007 Nov 1;232(10):1275–88.

165. Poulsen RC, Firth EC, Rogers CW, Moughan PJ, Kruger MC. Specific Effects of γ -Linolenic, Eicosapentaenoic, and Docosahexaenoic Ethyl Esters on Bone Post-ovariectomy in Rats. *Calcif Tissue Int.* 2007 Dec 1;81(6):459–71.
166. Ing SW, Belury MA. Impact of conjugated linoleic acid on bone physiology: proposed mechanism involving inhibition of adipogenesis. *Nutr Rev.* 2011 Mar 1;69(3):123–31.
167. Das SK, Scott MT, Adhikary PK. Effect of the nature and amount of dietary energy on lipid composition of rat bone marrow. *Lipids.* 1975 Oct;10(10):584–90.
168. Alam SQ, Kokkinos PP, Alam BS. Fatty acid composition and arachidonic acid concentrations in alveolar bone of rats fed diets with different lipids. *Calcif Tissue Int.* 1993;53(5):330–2.
169. Kokkinos PP, Shaye R, Alam BS, Alam SQ. Dietary lipids, prostaglandin E2 levels, and tooth movement in alveolar bone of rats. *Calcif Tissue Int.* 1993;53(5):333–7.
170. Rosen C, Karsenty G, MacDougald O. Foreword: Interactions between bone and adipose tissue and metabolism. *Bone.* 2012;50(2):429.
171. Fazeli PK, Horowitz MC, MacDougald OA, Scheller EL, Rodeheffer MS, Rosen CJ, et al. Marrow Fat and Bone—New Perspectives. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013;98(3):935–45.
172. Martin RB, Zissimos SL. Relationships between marrow fat and bone turnover in ovariectomized and intact rats. *Bone.* 1991;12(2):123–31.
173. Elbaz A, Rivas D, Duque G. Effect of estrogens on bone marrow adipogenesis and Sirt1 in aging C57BL/6J mice. *Biogerontology.* 2009 Dec;10(6):747–55.
174. Ramos-Junior ES, Leite GA, Carmo-Silva CC, Taira TM, Neves KB, Colón DF, et al. Adipokine Chemerin Bridges Metabolic Dyslipidemia and Alveolar Bone Loss in Mice. *J Bone Miner Res.* 2017;32(5):974–84.
175. Li S, Jiang H, Wang B, Gu M, Zhang N, Liang W, et al. Effect of Leptin on Marrow Adiposity in Ovariectomized Rabbits Assessed by Proton Magnetic Resonance Spectroscopy: *J Comput Assist Tomogr.* 2018 Feb;1.
176. Sengupta P. The Laboratory Rat: Relating Its Age With Human's. *Int J Prev Med.* 2013 Jun;4(6):624–30.
177. Johnston BD, Ward WE. The Ovariectomized Rat as a Model for Studying Alveolar Bone Loss in Postmenopausal Women. *BioMed Res Int.* 2015;2015:1–12.
178. Thompson DD, Simmons HA, Pirie CM, Ke HZ. FDA guidelines and animal models for osteoporosis. *Bone.* 1995 Oct;17(4):S125–33.

179. Francisco JI, Yu Y, Oliver RA, Walsh WR. Relationship between age, skeletal site, and time post-ovariectomy on bone mineral and trabecular microarchitecture in rats. *J Orthop Res.* 2011;29(2):189–96.
180. Lelovas PP. The laboratory rat as an animal model for osteoporosis research. 2008 Oct;58(5):7.
181. Ames MS, Hong S, Lee HR, Fields HW, Johnston WM, Kim D-G. Estrogen deficiency increases variability of tissue mineral density of alveolar bone surrounding teeth. *Arch Oral Biol.* 2010 Aug;55(8):599–605.
182. Wronski TJ, Cintrón M, Dann LM. Temporal relationship between bone loss and increased bone turnover in ovariectomized rats. *Calcif Tissue Int.* 1988 Sep;43(3):179–83.
183. Scheller EL, Troiano N, VanHoutan JN, Bouxsein MA, Fretz JA, Xi Y, et al. Chapter Seven - Use of Osmium Tetroxide Staining with Microcomputerized Tomography to Visualize and Quantify Bone Marrow Adipose Tissue In Vivo. In: Ormond A. Macdougald, editor. *Methods in Enzymology.* Academic Press; 2014 [cited 2014 Oct 2]. p. 123–39. (Methods of Adipose Tissue Biology, Part A; vol. Volume 537).
184. Fournier C, Perrier A, Thomas M, Laroche N, Dumas V, Rattner A, et al. Reduction by strontium of the bone marrow adiposity in mice and repression of the adipogenic commitment of multipotent C3H10T1/2 cells. *Bone.* 2012 Feb;50(2):499–509.
185. Kerckhofs G, Stegen S, van Gastel N, Sap A, Falgayrac G, Penel G, et al. Simultaneous three-dimensional visualization of mineralized and soft skeletal tissues by a novel microCT contrast agent with polyoxometalate structure. *Biomaterials.* 2018 Mar;159:1–12.
186. Coutel X, Olejnik C, Marchandise P, Delattre J, Béhal H, Kerckhofs G, et al. A Novel microCT Method for Bone and Marrow Adipose Tissue Alignment Identifies Key Differences Between Mandible and Tibia in Rats. *Calcif Tissue Int.* 2018 Jan 30;
187. Jiang JMY, Sacco SM, Ward WE. Ovariectomy-Induced Hyperphagia Does Not Modulate Bone Mineral Density or Bone Strength in Rats. *J Nutr.* 2008 Jan 11;138(11):2106–10.
188. BRUKER. MicroCT morphometric analysis of trabecular bone in the rodent femur and tibia. BRUKER microCT;
189. BRUKER. Automated trabecular and cortical bone selection. BRUKER microCT;
190. Du Z, Steck R, Doan N, Woodruff M, Ivanovski S, Xiao Y. Estrogen deficiency associated bone loss in the maxilla: a methodology to quantify the changes in the maxillary intra-radicular alveolar bone in an ovariectomized rat osteoporosis model. *Tissue Eng Part C Methods.* 2014;141015001219004.

191. Jiao K, Dai J, Wang M-Q, Niu L-N, Yu S, Liu X-D. Age- and sex-related changes of mandibular condylar cartilage and subchondral bone: A histomorphometric and micro-CT study in rats. *Arch Oral Biol.* 2010 Feb;55(2):155–63.
192. Otsu N. A Threshold Selection Method from Gray-Level Histograms. *IEEE Trans Syst Man Cybern.* 1979 Jan;9(1):62–6.
193. Massart DL. Handbook of chemometrics and qualimetrics. Part A Part A. Amsterdam; New York: Elsevier; 1997 [cited 2018 Jun 24].
194. Thomas DK, Storlien LH, Bellingham WP, Gillette K. Ovarian hormone effects on activity, glucoregulation and thyroid hormones in the rat. *Physiol Behav.* 1986 Jan;36(3):567–73.
195. Choi DY, Sun KH, Won SY, Lee JG, Hu KS, Kim KD, et al. Trabecular bone ratio of the mandibular condyle according to the presence of teeth: a micro-CT study. *Surg Radiol Anat.* 2012 Feb 22;34(6):519–26.
196. Eijden TMGJ van, Helm PN van der, Ruijven LJ van, Mulder L. Structural and Mechanical Properties of Mandibular Condylar Bone. *J Dent Res.* 2006 Jan 1;85(1):33–7.
197. Giesen EBW, Ding M, Dalstra M, van Eijden TMGJ. Changed Morphology and Mechanical Properties of Cancellous Bone in the Mandibular Condyles of Edentate People. *J Dent Res.* 2004 Mar;83(3):255–9.
198. Felsenberg D, Boonen S. The bone quality framework: Determinants of bone strength and their interrelationships, and implications for osteoporosis management. *Clin Ther.* 2005 Jan;27(1):1–11.
199. Chappard D, Baslé M-F, Legrand E, Audran M. Trabecular bone microarchitecture: A review. *Morphologie.* 2008 Dec;92(299):162–70.
200. Dempster DW, Compston JE, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, et al. Standardized nomenclature, symbols, and units for bone histomorphometry: A 2012 update of the report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res.* 2013;28(1):2–17.
201. Parfitt AM, Mathews CH, Villanueva AR, Kleerekoper M, Frame B, Rao DS. Relationships between surface, volume, and thickness of iliac trabecular bone in aging and in osteoporosis. Implications for the microanatomic and cellular mechanisms of bone loss. *J Clin Invest.* 1983 Oct 1;72(4):1396–409.
202. Parfitt AM, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, Meunier PJ, et al. Bone histomorphometry: Standardization of nomenclature, symbols, and units: Report of the asbmr histomorphometry nomenclature committee. *J Bone Miner Res.* 1987;2(6):595–610.
203. Mavropoulos A, Ammann P, Bresin A, Kiliaridis S. Masticatory Demands Induce Region-Specific Changes in Mandibular Bone Density in Growing Rats. *Angle Orthod.* 2005 Jul 1;75(4):625–30.

204. Waarsing JH, Day JS, Verhaar JAN, Ederveen AGH, Weinans H. Bone loss dynamics result in trabecular alignment in aging and ovariectomized rats. *J Orthop Res.* 2006 Mar 31;24(5):926–35.
205. Boskey AL, Coleman R. Aging and Bone. *J Dent Res.* 2010 Dec 1;89(12):1333–48.
206. Parfitt AM. Age-related structural changes in trabecular and cortical bone: cellular mechanisms and biomechanical consequences. *Calcif Tissue Int.* 1984;36 Suppl 1:S123-128.
207. Aaron JE, Makins NB, Sagreiya K. The microanatomy of trabecular bone loss in normal aging men and women. *Clin Orthop.* 1987;(215):260–71.
208. Russo CR, Lauretani F, Seeman E, Bartali B, Bandinelli S, Di Iorio A, et al. Structural adaptations to bone loss in aging men and women. *Bone.* 2006 Jan 1;38(1):112–8.
209. Shanbhogue VV, Brixen K, Hansen S. Age- and Sex-Related Changes in Bone Microarchitecture and Estimated Strength: A Three-Year Prospective Study Using HRpQCT: AGE-RELATED CHANGES IN BONE MICROARCHITECTURE BY HRpQCT. *J Bone Miner Res.* 2016 Aug;31(8):1541–9.
210. Riggs BL, Wahner HW, Dunn WL, Mazess RB, Offord KP, Melton LJ. Differential changes in bone mineral density of the appendicular and axial skeleton with aging: relationship to spinal osteoporosis. *J Clin Invest.* 1981 Feb 1;67(2):328–35.
211. Dempster DW. Bone microarchitecture and strength. *Osteoporos Int.* 2003;14(0):54–6.
212. Thomsen JS, Ebbesen EN, Mosekilde LI. Age-related differences between thinning of horizontal and vertical trabeculae in human lumbar bone as assessed by a new computerized method. *Bone.* 2002 Jul;31(1):136–42.
213. Thomsen JS, Ebbesen EN, Mosekilde L. Zone-dependent changes in human vertebral trabecular bone: clinical implications. *Bone.* 2002 May;30(5):664–9.
214. Compston JE, Mellish RWE, Garrahan NJ. Age-Related changes in iliac crest trabecular microanatomic bone structure in man. *Bone.* 1987 Jan 1;8(5):289–92.
215. Nagaraja S, Lin ASP, Guldberg RE. Age-related changes in trabecular bone microdamage initiation. *Bone.* 2007 Apr 1;40(4):973–80.
216. Mosekilde L. Age-related changes in bone mass, structure, and strength--effects of loading. *Z Rheumatol.* 2000;59 Suppl 1:1–9.
217. Eriksen EF. Normal and Pathological Remodeling of Human Trabecular Bone: Three Dimensional Reconstruction of the Remodeling Sequence in Normals and in Metabolic Bone Disease. *Endocr Rev.* 1986 Nov 1;7(4):379–408.

218. Henriksen K, Leeming DJ, Byrjalsen I, Nielsen RH, Sorensen MG, Dziegiel MH, et al. Osteoclasts prefer aged bone. *Osteoporos Int.* 2007 Jun 1;18(6):751–9.
219. Riggs BL, Khosla S, Melton LJ. Sex Steroids and the Construction and Conservation of the Adult Skeleton. *Endocr Rev.* 2002 Jun 1;23(3):279–302.
220. Mosekilde L, Ebbesen EN, Tornvig L, Thomsen JS. Trabecular bone structure and strength - remodelling and repair. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2000;1(1):25–30.
221. Parfitt AM, Mathews CH, Villanueva AR, Kleerekoper M, Frame B, Rao DS. Relationships between surface, volume, and thickness of iliac trabecular bone in aging and in osteoporosis. Implications for the microanatomic and cellular mechanisms of bone loss. 1983
222. Kleerekoper M, Villanueva AR, Stanciu J, Rao DS, Parfitt AM. The role of three-dimensional trabecular microstructure in the pathogenesis of vertebral compression fractures. *Calcif Tissue Int.* 1985 Dec;37(6):594–7.
223. Ciarelli TE, Fyhrie DP, Schaffler MB, Goldstein SA. Variations in Three-Dimensional Cancellous Bone Architecture of the Proximal Femur in Female Hip Fractures and in Controls. *J Bone Miner Res.* 2000 Jan 1;15(1):32–40.
224. Manolagas SC, Parfitt AM. What old means to bone. *Trends Endocrinol Metab.* 2010 Jun;21(6):369–74.
225. Manolagas SC. From Estrogen-Centric to Aging and Oxidative Stress: A Revised Perspective of the Pathogenesis of Osteoporosis. *Endocr Rev.* 2010 Jun;31(3):266–300.
226. Boyd SK, Davison P, Müller R, Gasser JA. Monitoring individual morphological changes over time in ovariectomized rats by in vivo micro-computed tomography. *Bone.* 2006 Oct;39(4):854–62.
227. Gaumet N, Seibel M, Barlet J. Influence of OVX on bone metabolism in very old rats. 1996;
228. Brouwers JEM, Lambers FM, Gasser JA, Rietbergen B van, Huiskes R. Bone Degeneration and Recovery after Early and Late Bisphosphonate Treatment of Ovariectomized Wistar Rats Assessed by In Vivo Micro-Computed Tomography. *Calcif Tissue Int.* 2008 Feb 20;82(3):202–11.
229. Wronski TJ, Dann LM, Horner SL. Time course of vertebral osteopenia in ovariectomized rats. *Bone.* 1989;10(4):295–301.
230. Kishi T, Hagino H, Kishimoto H, Nagashima H. Bone Responses at Various Skeletal Sites to Human Parathyroid Hormone in Ovariectomized Rats: Effects of Long-term Administration, Withdrawal, and Readministration. *Bone.* 1998 May;22(5):515–22.

231. Borah B, Dufresne TE, Chmielewski PA, Gross GJ, Prenger MC, Phipps RJ. Risedronate Preserves Trabecular Architecture and Increases Bone Strength in Vertebra of Ovariectomized Minipigs as Measured by Three-Dimensional Microcomputed Tomography. *J Bone Miner Res.* 2002 Jul 1;17(7):1139–47.
232. Lane NE, Thompson JM, Haupt D, Kimmel DB, Modin G, Kinney JH. Acute Changes in Trabecular Bone Connectivity and Osteoclast Activity in the Ovariectomized Rat In Vivo. *J Bone Miner Res.* 1998 Feb 1;13(2):229–36.
233. Legrand E, Chappard D, Pascaretti C, Duquenne M, Krebs S, Rohmer V, et al. Trabecular Bone Microarchitecture, Bone Mineral Density, and Vertebral Fractures in Male Osteoporosis. *J Bone Miner Res.* 2000 Jan 1;15(1):13–9.
234. Di Iorgi N, Mo AO, Grimm K, Wren TAL, Dorey F, Gilsanz V. Bone Acquisition in Healthy Young Females Is Reciprocally Related to Marrow Adiposity. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010 Jun;95(6):2977–82.
235. Theye CEG, Hattingh A, Cracknell TJ, Oetllé AC, Steyn M, Vandeweghe S. Dento-alveolar measurements and histomorphometric parameters of maxillary and mandibular first molars, using micro-CT. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2018 Aug;20(4):550–61.
236. Geurs NC, Lewis CE, Jeffcoat MK. Osteoporosis and periodontal disease progression. *Periodontol 2000.* 2003 Jun;32(1):105–10.
237. Taguchi A, Tanimoto K, Suei Y, Wada T. Tooth loss and mandibular osteopenia. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology.* 1995;79(1):127–32.
238. Barngkgei I, Al Haffar I, Shaarani E, Khattab R, Mashlah A. Assessment of jawbone trabecular bone structure amongst osteoporotic women by cone-beam computed tomography: the OSTEOSYR project. *J Investig Clin Dent.* 2016 Nov 1;7(4):332–40.
239. Elovic RP, Hipp JA, Hayes WC. Ovariectomy decreases the bone area fraction of the rat mandible. *Calcif Tissue Int.* 1995;56(4):305–10.
240. Wronski TJ, Lowry PL, Walsh CC, Ignaszewski LA. Skeletal alterations in ovariectomized rats. *Calcif Tissue Int.* 1985;37(3):324–8.
241. Devlin H, Whelton C. Can mandibular bone resorption predict hip fracture in elderly women? A systematic review of diagnostic test accuracy. *Gerodontology.* 2015 Sep;32(3):163–8.
242. Hassani-Nejad A, Ahlqwist M, Hakeberg M, Jonasson G. Mandibular trabecular bone as fracture indicator in 80-year-old men and women. *Eur J Oral Sci.* 2013 Dec;121(6):525–31.
243. Kribbs PJ. Comparison of mandibular bone in normal and osteoporotic women. *J Prosth Dent.* 1990;63(2):218–22.

244. Krall EA. The Periodontal-Systemic Connection: Implications for Treatment of Patients With Osteoporosis and Periodontal Disease. *Ann Periodontol.* 2001 Dec;6(1):209–13.
245. Lafage-Proust M-H, Roche B, Langer M, Cleret D, Vanden Bossche A, Olivier T, et al. Assessment of bone vascularization and its role in bone remodeling. *BoneKEy Rep.* 2015
246. Chappard D, Pascaretti-Grizon F, Gallois Y, Mercier P, Baslé MF, Audran M. Medullar fat influences texture analysis of trabecular microarchitecture on X-ray radiographs. *Eur J Radiol.* 2006 Jun 1;58(3):404–10.

ANNEXE(S)

Corrélations paramètres microstructure osseuse/adiposité médullaire

1 variable d'ajustement : poids des animaux

1. Groupes SHAM (temps poolés)

Spearman Partial Correlation Coefficients, N=29

➤ Site : Tibia

	BV/TV	Ma.V/TV	BS/BV	Tb.N	Tb.Th	Tb.Sp	Tb.Pf	DA
Ad.V/TV	r=0,23414 p=0,2304	r=-0,23414 p=0,2304	r=0,03841 p=0,8461	r=0,29859 p=0,1227	r=-0,14655 p=0,4568	r=-0,32967 p=0,0867	r=-0,29264 p=0,1307	r=-0,03210 p=0,8712
Ad.V/Ma.V	r=0,27552 p=0,1559	r=-0,27552 p=0,1559	r=0,01041 p=0,9581	r=0,33452 p=0,0819	r=-0,13594 p=0,4904	r=-0,37615 p=0,0485	r=-0,33104 p=0,0853	r=-0,05396 p=0,7851

Spearman Partial Correlation Coefficients, N=28

➤ Site : Alveolar bone

	BV/TV	Ma.V/TV	BS/BV	Tb.N	Tb.Th	Tb.Sp	Tb.Pf	DA
Ad.V/TV	r=-0,11048 p=0,5833	r=0,10937 p=0,5871	r=-0,11654 p=0,5627	r=-0,26433 p=0,1827	r=-0,16233 p=0,4185	r=0,21460 p=0,2824	r=-0,09978 p=0,6205	r=-0,31154 p=0,1137
Ad.V/Ma.V	r=0,00046 p=0,9982	r=-0,00175 p=0,9931	r=-0,12603 p=0,5311	r=-0,14743 p=0,4630	r=0,12177 p=0,5451	r=0,11523 p=0,5671	r=-0,19708 p=0,3245	r=-0,34232 p=0,08505

2. Groupes OVX_AL/OVX_PF (temps poolés)

Spearman Partial Correlation Coefficients, N=40

➤ Site : Tibia

	BV/TV	Ma.V/TV	BS/BV	Tb.N	Tb.Th	Tb.Sp	Tb.Pf	DA
Ad.V/TV	r=-0,09078 p=0,5826	r=0,09078 p=0,5826	r=-0,52448 p=0,0006	r=0,02198 p=0,8943	r=-0,47128 p=0,0025	r=-0,01226 p=0,9410	r=0,28957 p=0,0738	r=-0,43806 p=0,0053
Ad.V/Ma.V	r=0,05571 p=0,7362	r=-0,05571 p=0,7362	r=-0,52487 p=0,0006	r=0,17145 p=0,2966	r=-0,54916 p=0,0003	r=-0,14481 p=0,3791	r=0,19628 p=0,2311	r=-0,50727 p=0,0010

Spearman Partial Correlation Coefficients, N=39

➤ Site : Alveolar bone

	BV/TV	Ma.V/TV	BS/BV	Tb.N	Tb.Th	Tb.Sp	Tb.Pf	DA
Ad.V/TV	r=-0,47637 p=0,0025	r=0,42064 p=0,0085	r=0,15192 p=0,3626	r=-0,44529 p=0,0051	r=-0,01572 p=0,9254	r=0,47850 p=0,0024	r=0,30888 p=0,0592	r=0,00825 p=0,9608
Ad.V/Ma.V	r=-0,34162 p=0,0358	r=0,28531 p=0,0825	r=0,07132 p=0,6705	r=-0,31392 p=0,0549	r=0,03160 p=0,8506	r=0,35635 p=0,0281	r=0,18511 p=0,2659	r=0,03265 p=0,8457

PRODUCTION SCIENTIFIQUE

Ce travail a bénéficié d'une subvention de recherche individuelle de la Société Française de Rhumatologie (SFR).

Il a également fait l'objet de publications et communications lors de congrès scientifiques.

PUBLICATIONS

- I. Coutel.X, Olejnik.C, Marchandise.P, Delattre.J, Béhal.H, Kerckhofs.G, Penel.G. A novel microCT method for Bone and Marrow Adipose Tissue Alignment identifies key differences between mandible and tibia. *Calcified Tissue International*. 2018 103: 189. [DOI : 10.1007/s00223-018-0397-1](https://doi.org/10.1007/s00223-018-0397-1)
- II. Coutel.X, Olejnik.C, Marchandise.P, Delattre.J, Kerckhofs.G, Penel.G. Etude de la conversion adipeuse médullaire mandibulaire au cours de l'ostéoporose : Approche 3D par micro-CT de sa topographie dans le modèle de la ratte adulte ovariectomisée. *Revue du rhumatisme*. Nov. 2017, vol. 84, supplément 1. ISSN 1169-8330

COMMUNICATIONS

- I. Coutel.X, Olejnik.C, Falgayrac.G, During.A, Penel.G. Short-term effects of zoledronic acid on bone quality at the molecular level in the rat mandibles. *17^{èmes} JFBTM, 4-6 février 2015 Super-Besse (Clermont-Ferrand), France* (Flash poster, primé).
- II. Coutel.X, Olejnik.C, Marchandise.P, Penel.G. Sample preparation for microCT imaging of bone marrow adiposity: A pilot study comparing 3 distinct protocols in

rats. *1st international BMA meeting – From marrow adipocytes to clinical issues, 28-29 août 2015, Lille, France* (Communication affichée)

- III. Coutel.X, Olejnik.C, During.A, Falgayrac.G, Penel.G. Analyse comparative de la composition osseuse mandibulaire, alvéolaire et basale, par microspectroscopie Raman chez le rat. Forum des Jeunes Chercheurs en Odontologie, 24-25 septembre 2015, Lille, France (Communication orale)
- IV. Coutel.X, Olejnik.C, Marchandise.P, Chauveau.C, Penel.G. Mandibular bone: an unusual trabecular bone? *43rd ECTS meeting, 14-17 mai 2016, Rome, Italie* (Communication affichée)
- V. Coutel.X, Olejnik.C, Marchandise.P, Chauveau.C, Penel.G. Assessment of Bone Marrow Adiposity (BMA) in the mandible: a pilot study in adult rats. *18^{èmes} JFBTM, 1-3 juin 2016, Nancy, France* (Communication affichée)
- VI. Coutel.X, Olejnik.C, Marchandise.P, Kerckhofs.G, Chauveau.C, Penel.G. Assessment of bone marrow adiposity in the mandible of adult ovariectomized rats. *2nd international BMA meeting – From marrow adipocytes to clinical issues, 25-26 août 2016, Rotterdam, The Netherlands* (Communication affichée)
- VII. Coutel.X, Olejnik.C, Falgayrac.G, Penel.G. Short-term effects of zoledronic acid on bone quality at the molecular level in the rat mandibles. *ADA meeting 2016, 20-25 octobre 2016, Denver, Colorado, USA* (Communication affichée numérique)
- VIII. Coutel.X, Delattre.J, Marchandise.P, Kerckhofs.G, Olejnik.C, Penel.G. Specificity of bone marrow adiposity distribution in the rat mandibles compared to tibiae. *19^{èmes} JFBTM, 18-20 mai 2017, Lyon, France* (Communication orale)
- IX. Coutel.X, Delattre.J, Marchandise.P, Kerckhofs.G, Chauveau.C, Lucas.S, Olejnik.C, Penel.G. Long-term effects of ovariectomy on mandibular bone micro-architecture and bone marrow adiposity in adult rats. *3rd international BMA*

meeting – From marrow adipocytes to clinical issues, Lausanne, Switzerland
(Communication affichée)

- X. Coutel.X, Delattre.J, Marchandise.P, Kerchofs.G, Olejnik.C, Penel.G. Aging does not impact bone marrow adipose content in rat mandibles. *CED-IADR/NOF Oral Health Research Congress, 21-23 septembre 2017, Vienne, Autriche*
(Communication orale)
- XI. Coutel.X, Delattre.J, Marchandise.P, Falgayrac.G, Kerckhofs.G, Olejnik.C, Penel.G. Modifications de la microstructure osseuse et de l'adiposité médullaire à court et long terme dans la mandibule chez la ratte adulte ovariectomisée. *Forum des Jeunes Chercheurs en Odontologie, 12-13 octobre 2017, Bordeaux, France*
(Communication orale)
- XII. Coutel.X, Olejnik.C, Marchandise.P, Delattre.J, Kerckhofs.G, Cortet.B, Penel.G. Etude de la conversion adipeuse médullaire mandibulaire au cours de l'ostéoporose : Approche 3D par micro-CT de sa topographie dans le modèle de la ratte adulte ovariectomisée. *30^{ème} congrès de la Société Française de Rhumatologie, 10-12 décembre 2017, Paris, France* (Communication affichée numérique)
- XIII. Coutel.X, Delattre.J, Marchandise.P, Kerckhofs G, Penel.G, Olejnik.C. Long-term follow-up of the bone marrow adipose tissue distribution in ovariectomized rats reveals a clustering of adipocytes at the tibiae trabecular bone surface. *45th ECTS meeting, 26-29 mai 2018, Valence, Espagne* (communication affichée)
- XIV. Coutel.X, Delattre.J, Marchandise.P, Kerckhofs G, Penel.G, Olejnik.C. Long-term follow-up of the bone marrow adipose tissue distribution in alveolar bone and condyle of ovariectomized rats mandible. *4th BMA meeting, 29-31 aout 2018, Lille, France.*

A novel microCT method for bone and marrow adipose tissue alignment identifies key differences between mandible and tibia in rats.

Xavier COUTEL^{*1}, Cécile OLEJNIK¹, Pierre MARCHANDISE¹, Jérôme DELATTRE¹, Hélène BEHAL², Greet KERCKHOFS^{3,4}, Guillaume PENEL¹

1: Univ.Lille, Univ. Littoral Côte d'Opale, EA 4490 - PMOI – Physiopathologie des Maladies Osseuses Inflammatoires, F-59000 Lille, France; xavier.coutel@univ-lille2.fr

2: Univ. Lille, CHU Lille, EA 2694 - Santé publique: épidémiologie et qualité des soins, Unité de Méthodologie et Biostatistiques, F-59000 Lille, France

3: Skeletal Biology and Engineering Center, Dept. Development and Regeneration, KU Leuven, Belgium

4: Prometheus, Division of Skeletal Tissue Engineering, KU Leuven, Belgium

ABSTRACT

Bone homeostasis is influenced by the bone marrow adipose tissue (BMAT). BMAT distribution varies from one anatomical location in the skeleton to another. We developed an advanced microfocus computed tomography (microCT) imaging and analysis protocol that allows accurate alignment of both the BMAT distribution and bone micro-architecture as well as calculation of the distance of the BMAT adipocytes from the bone surface. Using this protocol, we detected a different spatial BMAT distribution between the rat tibia and mandible: in the proximal metaphysis of the tibia a large amount of BMAT (~20% of the total BMAT) was located close to the bone surface (<20 μm), whereas in the alveolar ridge ~30% of the total BMAT was located between 40 and 60 μm from the bone surface. In the alveolar ridge of rats, the trabecular bone volume was 48.3% higher compared to the proximal metaphysis of the tibia ($p<0.0001$) and the percentage of adiposity determined to the relative marrow volume was lower (1.5%) compared to the proximal metaphysis of the tibia (9%, $p=0.0002$). Interestingly, in the tibia a negative correlation was found between the percentage of adiposity in the total volume and the trabecular thickness ($r=-0.74$, $p=0.037$). The present study highlights that in comparison to tibial proximal metaphysis, the mandibular bone exhibits a massive trabecular network and a low BMAT content with almost no contact with the bone surface. These findings are of great interest because of the importance of the fat-bone interaction and its current involvement in several resorptive bone diseases.

Keywords: Rats – Jaw bone – Osmium staining – Bone structure – Micro-computed tomography imaging – Adipocytes

Introduction

Through the last decades, adipose tissues have revealed their diversity regarding their cellular composition, anatomical location and physiopathological properties [1, 2]. Among the fat depots, bone marrow adipose tissue (BMAT) emerges as a distinct fat depot regarding the size, distribution and metabolic function of the marrow adipocytes [3–5]. The presence of this adipose tissue and its normal age-related conversion in the bone marrow was a long-standing knowledge thanks to histomorphometry and magnetic resonance imaging (MRI) but has been surprisingly disregarded in the craniofacial skeleton. Distribution of the BMAT in the skeleton is a tightly regulated process with skeletal site specificities [6–8].

Recently, in rodents, BMAT content and composition have been reported to be differently distributed between the distal and the proximal metaphysis in the tibia. But the status of the mandible is still not clear. In the jaws, two functional areas characterized by a high bone remodeling activity have been identified in rats: the alveolar ridge and the condyle [9]. Yamada *et al.* established that the conversion of hematopoietic to fatty marrow in young subjects occurs first in the mandibular corpus followed by the ramus and finally the condyle [10]. The BMAT content within the alveolar ridge remains to be elucidated on adults and the influence of the teeth on the alveolar ridge BMAT content have not been evaluated to date. Lack of knowledge regarding the BMAT location and composition in the craniofacial skeleton particularly in presence or absence of the teeth impairs our understanding of not only bone homeostasis during aging but also a broad range of pathological conditions including periodontal diseases.

Although BMAT origin, development and function are still being determined, its importance in bone-fat interactions remains of high clinical interest [11–13]. From clinical findings, marrow fat composition also plays a role in skeletal homeostasis [14–16]. Recent studies in both human and animal models indicate a relationship between the amount of BMAT and several bone diseases [17–19]. BMAT is also involved in the regulation of hematopoiesis [20] and modified during aging [21]. Through aging, an increase of BMAT content was observed and appears to be inversely correlated to decrease trabecular bone volume in iliac crest [22]. The bone remodeling activity seems to be modulated by the local bone marrow microenvironment adjacent to bone surface [23, 24]. Consistent with the importance of paracrine signaling of BMAT, *in vitro* co-culture studies from our lab by Clabaut *et al.*

suggest that adipocytes may affect bone cells fate by promoting trans-differentiation (or re-programming) of osteogenic cells [25]. To understand bone-fat interactions, the relationship between bone and BMAT proximity deserves careful consideration especially among bone sites. Li *et al.* reported also histomorphometric data in vertebrae and concluded that skeletal sites with high yellow marrow fat content, such as caudal vertebrae or distal tibiae, did not induce cancellous bone osteopenia [26].

The anatomical dissemination and the difficulties to access BMAT still hamper our understanding of the relative involvement of BMAT in health and diseases. The aim of the present study was to develop an original microCT imaging and analysis protocol that combines two registered microCT scans of the same sample from which both the micro-architecture and the BMAT content (using osmium tetroxide staining) can be calculated. This novel protocol allowed to establish the BMAT status of both the mandibular alveolar ridge and condyle compared with the tibial metaphysis in a rat model. Moreover, and uniquely, it allowed to investigate the distance between BMAT and trabecular bone surface.

Material & Methods

Animal Procedures

Six month old female Sprague-dawley rats (n=9) with a homogeneous weight of 361g (± 18 g, SD) were provided by Janvier Lab (Laval, France). The provider reports that the rats were free of known viral, bacterial and parasitic pathogens, in accordance with the approval obtained by the Veterinary Department of the French Ministry of Agriculture (approval no. B 53-103-02). All experiments on animals were carried out in an accredited animal facility (authorization no. B5935010) at the University of Lille under the approval of the Animal Ethic Committee and in accordance with the directive 2010/63/EU and the "Principles of Laboratory Animal Care" recommended by the National Society for Biomedical Research in France. Rats (n=3/cage) were housed in type 4 cages filled with Lignocel[®] (hygiene animal bedding) enriched with horizontal tubes for climbing under controlled conditions at $22 \pm 2^\circ\text{C}$ on a 12h light/12h dark cycle with lights on from 7.00 a.m to 7.00 p.m. They were fed *ad libitum* (free access to tap water and standard chow diet). Rats were euthanized by exsanguinations under anesthesia at 6 months. At sacrifice, right hemi-mandibles and tibiae were harvested, immediately fixed for 48h in 10% neutral-buffered formalin and stored in phosphate buffered saline prior to further analyses.

MicroCT image acquisition and reconstruction: SCAN 1

To assess simultaneously the bone micro-architecture and the BMAT content, the trabecular area was investigated in three skeletal locations: (i) the intra-radicular tooth-bearing (alveolar) bone of the first molar, (ii) the central area of the mandibular condyle in the mandibles and (iii) the secondary spongiosa of the tibial metaphysis (Fig. 1).

All bone samples were scanned a first time (i.e. SCAN1) to allow analysis of the trabecular bone morphometric parameters. Specimens (mandibles and tibiae) were placed in a plastic sample holder and were scanned using a Skyscan 1172 microCT device (Bruker MicroCT, Kontich, Belgium). The software suite provided by the manufacturer was used for image acquisition, reconstruction, analysis and 3D visualization (Skyscan 1172[®], NRecon[®], Dataviewer, CTAn[®], CTVox[™]).

Scan settings were as follows: isotropic voxel size 10 μm^3 , 80 kVp, 100 μA , Al-Cu filter, 2400ms integration time, 0.5° rotation step over 180°.

For the reconstruction (NRecon[®]), the following settings were applied to clearly distinguish the mineralized compartment of the bone from the bone marrow: Gaussian smoothing, ring artifact reduction 6, beam hardening correction 50%.

Osmium tetroxide staining protocol

After these first acquisitions, samples were prepared for BMAT analysis. Thus, all the bone samples were decalcified under controlled slow oscillations in 4% formic acid/10% NBF (1:1), pH 7.4, for 4 days. Once demineralized, they were rinsed in distilled water. Each decalcified bone was then stained in the fume hood for 48h in a 45ml staining solution that was composed of a 1% osmium tetroxide solution stabilized in a 2.5% dichromate potassium solution at room temperature. Then, the bones were washed, in the same tube, by removing the staining solution and soaking the stained bones in 45ml of PBS for 3h at room temperature. This washing step was repeated twice and the last wash was left in the hood overnight. Osmium stained bones were then moved to a fresh set of 50 ml falcon tubes containing 45ml of PBS each and were stored at +4°C until microCT acquisition.

MicroCT image acquisition and reconstruction: SCAN 2

After osmium tetroxide staining, the decalcified and stained bone samples were scanned a second time (i.e. SCAN2) to allow analysis of the BMAT.

Samples were scanned using the same acquisition settings as for the first scan.

For the reconstruction of the SCAN2 datasets, the following settings were applied to reveal osmium-stained BMAT: Gaussian smoothing, ring artifact reduction 3, beam hardening correction 30%.

Image datasets alignment (SCAN1 and SCAN2 registration)

The SCAN1 and SCAN2 datasets were rotated to obtain the same orientation, which was specific for each skeletal location (the longitudinal axis of the proximal metaphysis in the tibia and the mandibular condyle and the first molar in the alveolar ridge for the mandible, see Fig. 1). Then, the reoriented datasets of each sample (SCAN1 as reference, SCAN2 as target) were manually registered using Dataviewer software (v. 1.5.2.4) following these critical steps: (i) co-registration of the global outlines; (ii) adjustment of the enamel of the rodent incisor (in case of the alveolar ridge) and (iii) progressive adjustment of the trabecular network and bone marrow space using the profile scale diagram and different angles of view (Fig.1).

Determination of the Regions of Interest (ROI)

After registration, regions of interest (ROI) were drawn in the SCAN1 datasets that delineated the trabecular area of the samples using CTAn. For the alveolar ridge, ROIs were selected as the intra-radicular bone of the first molar from the furcation to the apex roots, as adapted from the protocol of Du *et al.* (modification: oval shape instead of a circular one) [27]. In the condyle, the ROI was selected according to the method described by Jiao *et al.* as a rectangle shape (1mm length, 0,5mm height) in the central compartment (Fig. 1) [28]. In the proximal tibia, 200 cross-sections (2mm height) were selected 1.5mm under the growth plate and the trabecular area was isolated from the cortical area by a semi-automated protocol in CTAn[®] [29].

MicroCT image analysis - trabecular bone micro-architecture

In these ROIs of the SCAN 1 datasets, a one-level Otsu's method was used to determine the threshold between the mineralized tissue and the bone marrow compartment (and vice versa) [30], and the following bone microstructural parameters, reflecting the morphology of the trabecular network for each skeletal location, were measured using CTAn[®]: percent bone volume (BV/TV, %), percent marrow volume (Ma.V/TV, %), trabecular bone surface/volume ratio (BS/TV, mm⁻¹), trabecular number (Tb.N, mm⁻¹), trabecular thickness (Tb.Th, mm), trabecular separation (Tb.Sp, mm) and trabecular pattern factor (Tb.Pf, mm⁻¹).

MicroCT image analysis – BMAT content and distribution

For quantification of the BMAT content, each defined ROI of the SCANS 1 datasets was re-used on the co-registered SCAN2 dataset in order to determine the BMAT content in the same area as where the bone micro-architecture was assessed. For the mandibular bone, a fixed threshold value (between 110 and 255 grayscale levels) was used for both skeletal locations. In the tibia, the BMAT was segmented using a multilevel Otsu algorithm (3 levels). The following BMAT parameters were measured for each skeletal location: percentage of adipocyte volume in the total volume of the ROI (Ad.V/TV, %) and, in an original way, the ratio adipocyte volume/marrow volume (Ad.V/Ma.V, %) which constitute a novel 3D parameter. To assess the spatial distribution profile of BMAT in relation to the bone surface, a customized step-wise process (i.e task list) was created in CTAn[®] to plot the percentage of adiposity versus the distance from the trabecular bone surface. This task list combines, after uploading the segmented osmium stained BMAT from the SCAN2 datasets as the image and the binarized trabecular network of the SCAN1 datasets as ROI,

1. one-level Otsu thresholding,
2. morphological operation : 20 μm 3D dilatation step (2 pixels),
3. saving images,
4. 3D morphological analysis to determine the percentage of adiposity in this volume.

Based on the trabecular separation parameter, these 4 tasks have been repeated 7 times to cover the entire marrow cavity.

Statistical analyses

All statistical methods were performed with SAS software package, release 9.4 (SAS Institute, Cary, NC). Data are presented as mean \pm standard deviation (SD). Normality of distributions was assessed graphically and using the Shapiro-Wilk test.

Comparison between the three skeletal locations was made using a linear mixed model in order to take into account the correlation between the repeated measures within subjects (one measure per location) by including a random subject effect. Post-hoc pairwise comparisons between skeletal locations were performed. Residuals of the model were checked.

Relationship between trabecular bone micro-architecture and BMAT content was assessed using a linear mixed model in order to take into account the correlation between the repeated measures within subjects. This model included interaction term between the location and the distance of trabecular bone surface. If significant interaction was observed, difference

between each site was assessed at each distance of trabecular bone surface using linear contrasts.

Correlation between variables was examined among each site by a Spearman's rank correlation coefficient. Statistical significance for all above tests was set at $p < 0.05$.

Results

Our novel microCT imaging and analysis protocol allowed accurate and simultaneous characterization of the trabecular bone micro-architecture and the BMAT content and spatial distribution within the same anatomical location (Fig. 1). Three skeletal sites (alveolar ridge, condyle and proximal tibia) in rats have been investigated by this approach in the present study.

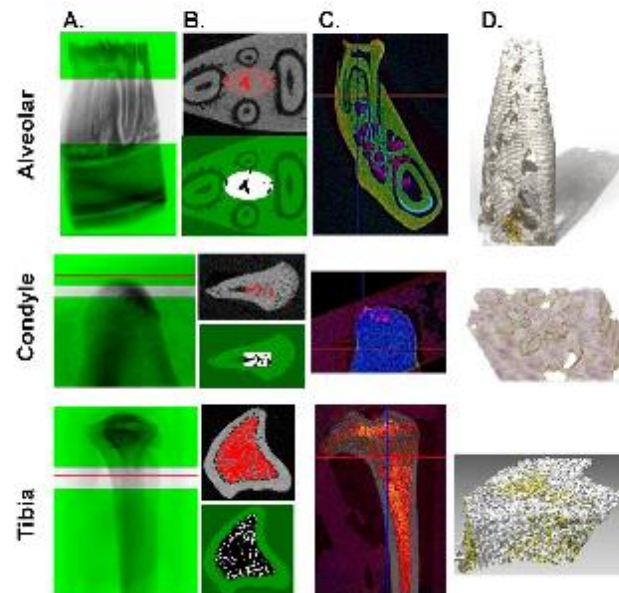


Fig. 1. Global approach to co-investigate the trabecular bone micro-architecture and the BMAT in the mandible (alveolar and condylar bone) and in the tibia.

A. Shadow projections showing the volume of interest.

B. Cross-sections illustrating the trabecular ROI and the corresponding cross-section after binarization of the trabecular network.

C. Registration of SCAN1 and SCAN2 datasets

D. 3D rendering of the trabecular bone network (white) and BMAT (yellow) within the ROI.

Trabecular bone micro-architecture

Micro-architectural differences were found between the three skeletal locations (Fig. 2). More specifically, BV/TV was 48.3% higher in the alveolar ridge and 58.2% higher in the condyle compared to tibial metaphysis. Tb.N was 20.9% higher in the alveolar ridge and 24.1% higher in the condyle compared to the tibial metaphysis, and this was associated with an increased mean trabecular thickness of 38.5% in the alveolar ridge and 46.7% in the condyle compared to tibia. Tb.Sp was similar for the alveolar ridge and the tibial metaphysis, whereas the condyle exhibited a mean trabecular separation that was 81.8% higher than that of the tibial metaphysis. Tb.Pf was negative in the alveolar ridge and in the condyle while it was found to be positive in the tibia. BS/TV was found to be ~40% inferior in the alveolar ridge and the condyle in comparison with tibial metaphysis.

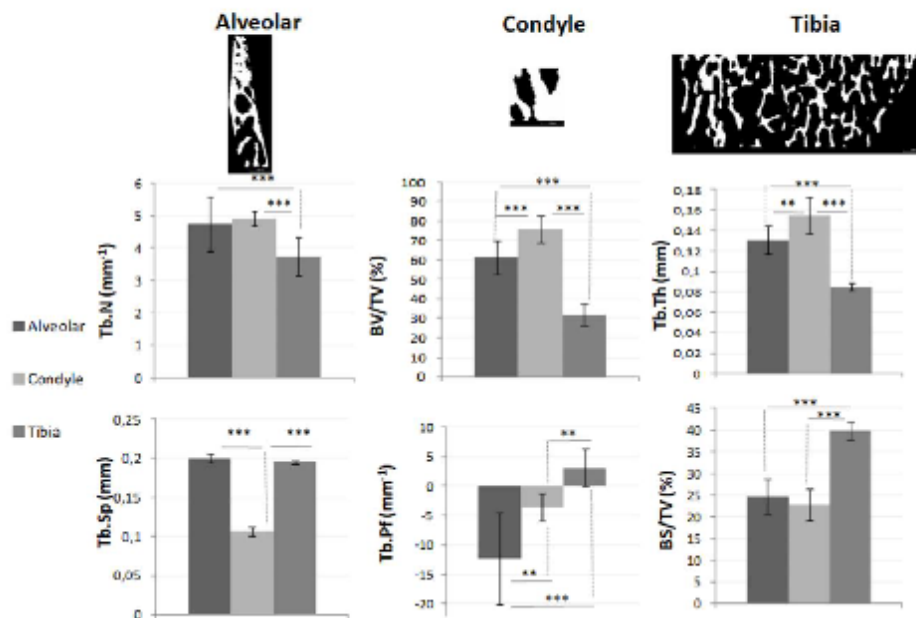


Fig. 2. Trabecular morphometric parameters (histograms) and representative 2D binarized sagittal cross-sections showing trabecular bone (white) and marrow cavities (black) in the three skeletal locations: BV/TV= trabecular bone volume/total volume ratio (%), Tb.N = trabecular number (mm⁻¹), Tb.Th = trabecular thickness (mm), Tb.Sp = trabecular separation (mm), Tb.Pf = trabecular pattern factor (mm⁻¹), BS/TV = bone surface/total volume ratio (mm⁻¹); - ** p<0.01, *** p<0.0001

BMAT content

BMAT content in relation to the trabecular bone was obtained using our novel microCT imaging and analysis protocol as shown in Fig. 1.D. The alveolar ridge showed a Ma.V/TV ratio that was 77.5% lower than that of the tibial metaphysis. The condyle exhibited an even higher difference compared to the tibial metaphysis (-185%, $p<0.0001$). No BMAT was observed in the condyle (Fig. 3). In the tibial metaphysis, the percentage of adipocyte volume was higher compared to the alveolar ridge both when determined relative to the total volume (6% vs 0.5%, $p<0.0001$) as to the marrow volume (9% vs 1.5%, $p=0.0002$).

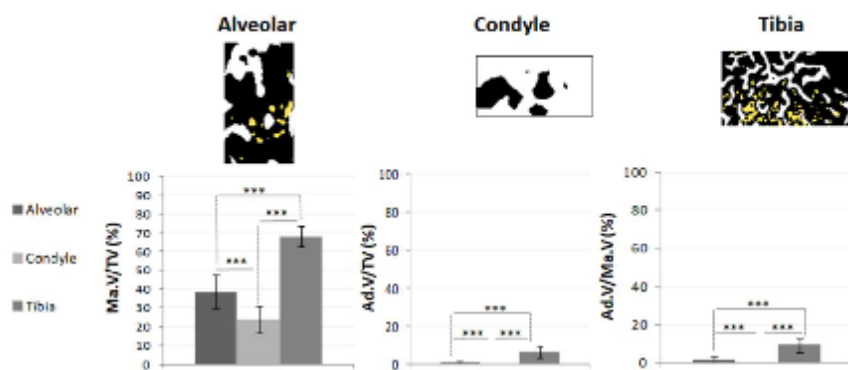


Fig. 3. Bone marrow adipose properties (histograms) and representative co-localisation of trabecular bone (white) and marrow adiposity (yellow) in 2D horizontal cross-sections after registration in the three skeletal locations: Ma.V/TV = marrow volume/total volume ratio (%), Ad.V/TV = adipose volume/total volume ratio (%), Ad.V/Ma.V = adipose volume/marrow volume ratio (%); - ** $p<0.001$, *** $p<0.0001$

Correlation and spatial relationship between the trabecular bone and the BMAT

A negative correlation was found in the tibia between the adipose volume/total volume ratio and the trabecular thickness ($r=-0.74$, $p=0.037$). For the two other skeletal locations, no significant correlations were found between the bone micro-architecture and the BMAT content. Our novel microCT imaging and analysis protocol uniquely allowed to assess the spatial relationship between the bone and the BMAT. No assessment of this spatial relationship was possible for the condyle, since there was no BMAT present in this location. In both the other skeletal locations, i.e. the alveolar ridge and the tibial metaphysis, it was seen that 50% of the adipocyte volume was located at a mean distance of 40 μ m from the

trabecular bone surface (Fig. 4A). Interestingly, in the tibial metaphysis there were more adipocytes located close to the trabecular surface (~25% located at 20 μ m; Fig. 4B) than in the alveolar ridge (~30% located between 40 and 60 μ m; Fig. 4B). Significant differences were found until 60 μ m.

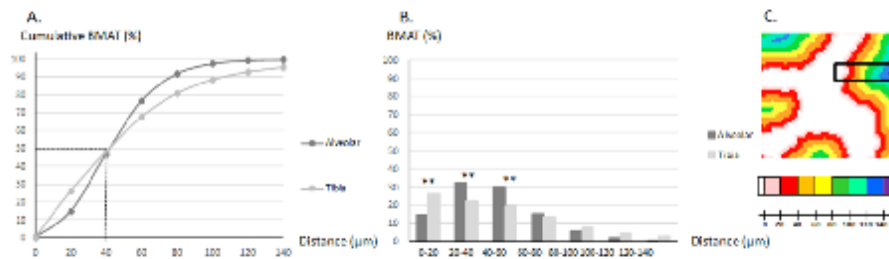


Fig. 4. Spatial relationship between the trabecular bone surface and the BMAT

- Cumulative percent of the BMAT in function of the distance to the trabecular bone surface.
- Distribution histogram of the BMAT content in the alveolar ridge and the tibial metaphysis in function of the distance to the trabecular bone surface.
- Representative image illustrating the novel approach of progressive dilatation of the trabecular bone network used as ROI to quantify the mean distance separating bone from adipose depots (color code), the white representing the bone trabeculae without any dilatation of the ROI.

Discussion

The rat model is considered as a suitable model for assessing the bone micro-architecture for many applications [31, 32]. The choice of the age is, however, crucial as the impact of skeletal maturation could impair the results. Rats experience a natural permanent skeletal growth until six months of age [33–35]. Therefore, six months is often reported in the recent literature as an accurate period to investigate bone or bone marrow changes so as to avoid any confounding factors due to growth or senescence. Since also the BMAT content is age-related, the age is an important aspect that has been taken into account in the present study, which assesses both the BMAT and the bone micro-architecture. Therefore, six-month-old rats have been selected for our study.

The present data showed skeletal location-related differences in the bone micro-architecture.

Indeed, a much denser bone micro-architecture was observed in the mandible (>50% in trabecular bone volume, >20% in trabecular number, >40% in trabecular thickness) compared to the tibial metaphysis. In addition, the negative trabecular pattern factor values indicates a more connected trabecular lattice and a prevalence of enclosed cavities with concave surfaces in the mandible while positive value indicates a more disconnected trabecular structure in the tibial metaphysis. BS/TV parameter, representing the specific surface, have been described as a good predictor of bone loss [36]. The higher value in the tibial metaphysis may explain its more sensitive response to bone loss in comparison to the jaws. Bone loss was found to be enhanced preferentially within limb in ovariectomized (OVX) animals studies. In normal protein diet-fed animals, OVX led to a reduction of BV/TV of 4.9% in the mandible but 82% in the tibia ($p < 0.001$) [37]. Elovic et al. reported that in the mandible of adult rats (~ 4 months), OVX led to a 15% and 28% increase in failure load and stiffness, respectively, but no change in bone area fraction or bone mineral density. In older rats (~6 months), OVX led to an 8% decrease in bone area fraction, but no change in failure load, stiffness, or bone mineral density of the mandible [38]. In human clinical situations of bone loss such as osteoporosis, the relationship between mandibular alteration and prediction of osteoporotic fracture is controversial and of low sensitivity [40, 41]. These site-skeletal differences could be in part explained by the masticatory activity, resulting in cyclic loads on the mandibular teeth-bearing bone compared to the long bones in animals [42, 43]. A higher bone turnover rate has also been reported in the jaws [44, 45].

The amount of trabecular bone was the highest in the condyle, with a mean trabecular volume of about 75%, followed by the alveolar ridge (61.5%) and finally the tibial metaphysis (32%). This higher bone volume in the condyle is associated with a higher mean trabecular density and thickness and a mean inter-trabecular distance that is twice less compared to the tibia or the alveolar ridge. These results are consistent with those of Choi *et al.*, who reported a denser microstructure in the condyle according to the presence or the absence of teeth in posterior sectors [46, 47]. Bresin *et al.* suggested that the continuously erupting incisor in the rat, which occupies a large part of the mandibular body, may also play a role in the micro-architecture of the teeth-bearing area [48]. However, in the present study, the ROI in which the bone micro-architecture was analyzed was chosen in a distant area from the incisor (inter-radicular bone of the first molar).

In terms of bone micro-architecture, the reported findings are in accordance with previous studies that focused on skeletal specificities [37], but they provide for the first time new information on the spatial distribution of BMAT in the mandible of mature rats. Using our novel microCT approach, we detected a different spatial BMAT distribution between the rat tibia and mandible: in the proximal metaphysis of the tibia a large amount of BMAT (~20% of the total BMAT) was located close to the bone surface (<20 μm), whereas in the alveolar ridge ~30% of the total BMAT was located between 40 and 60 μm from the bone surface. Interestingly, in the tibia a negative correlation was found between the percentage of adiposity in the total volume and the trabecular thickness ($r=-0.74$, $p=0.037$). No BMAT was observed in the condyle of the six-month-old female rats. This is in correspondence with the human study of Yamada *et al.*, in which later marrow adipose conversion is described in the condyle compared to the mandibular body [10].

Quantification of BMAT in animals (mainly mice) was first estimated by counting lipidic droplet cells on 2D histological sections. However, it was time-consuming, resource intensive and most of all inconsistent between laboratories as it may miss changes in 3D BMAT content. More recently, BMAT volume and heterogeneity was assessed by 3D approaches using microCT imaging to better understand the BMAT development, function and implication in bone diseases and treatment [21, 22]. However, the available studies present several limitations in the characterization of BMAT in relation to the bone surface and structure (i.e. no possible measurement of BMAT content regarding to the marrow volume, no determination of the spatial distribution of the BMAT and no quantification of both bone micro-architecture and BMAT within the same region of interest). To our best knowledge, this is the first study to allow an accurate characterization of both the BMAT distribution and

bone micro-architecture (after image datasets alignment) as well as calculation of the distance of the BMAT adipocytes from the bone surface. Taken together, the results of the present study report that mandibular bone has a denser bone micro-architecture compared to the tibial metaphysis, a lower bone marrow volume and a BMAT content located at distance from the trabecular bone surface.

Conclusion

Investigating and understanding the relationship between BMAT and bone quality has emerged as an exciting area of research. As pointed out by other groups, one should take into account the fat content in the marrow when assessing bone integrity as it may affect bone microstructure [49, 50]. BMAT has turned to be a heterogeneous fat depot whose adipocytes diverge in their phenotype and their response to stimuli according to their location in bone and its marrow environment [3]. With the help of a novel method aligning the bone and the BMAT in 3D, the present study establishes the BMAT content and distribution in alveolar and condyle sites of rat mandible. These results are crucial to have a better understanding of mandibular specific response during various physiopathological events that should be investigated with rat model.

Acknowledgements

The authors thank the staff of the animal care facility (DHURE, Lille, France) for supplying the help on surgical procedures. This study was supported by the French Society of Rheumatology (SFR). GK acknowledges the Research Foundation - Flanders for her postdoctoral grant (FWO/12R4315N) and her travel grant for a 6-months stay abroad in the PMOI lab.

Author contributions

GP, CO, XC conceived and designed the experiments. XC, CO, PM, JD, GK performed the experiments (acquisition, analysis and/or interpretation of the data). XC drafted the manuscript. All authors critically revised the article and approved the final manuscript.

Funding: This study was supported by the French Society of Rheumatology.

Compliance with ethical standards

Conflicts of interest: none

Human and Animal Rights and Informed Consent: All applicable international, national, and institutional guidelines for the care and use of animals were followed.

REFERENCES

1. Rosen ED, Spiegelman BM (2014) What We Talk About When We Talk About Fat. *Cell* 156:20–44 . doi: 10.1016/j.cell.2013.12.012
2. Lanske B, Rosen C (2017) Bone Marrow Adipose Tissue: The First 40 Years. *J Bone Miner Res* 32:1153–1156 . doi: 10.1002/jbmr.3140
3. Hardouin P, Marie PJ, Rosen CJ (2016) New insights into bone marrow adipocytes: Report from the First European Meeting on Bone Marrow Adiposity (BMA 2015). *Bone* 93:212–215 . doi: 10.1016/j.bone.2015.11.013
4. Eerden B van der, Wijnen A van (2017) Meeting report of the 2016 bone marrow adiposity meeting. *Adipocyte* 0:1–10 . doi: 10.1080/21623945.2017.1313374
5. Scheller EL, Rosen CJ (2014) What's the matter with MAT? Marrow adipose tissue, metabolism, and skeletal health. *Ann N Y Acad Sci* 1311:14–30 . doi: 10.1111/nyas.12327
6. Craft CS, Scheller EL (2016) Evolution of the Marrow Adipose Tissue Microenvironment. *Calcif Tissue Int* 1–15 . doi: 10.1007/s00223-016-0168-9
7. Scheller EL, Doucette CR, Learman BS, et al (2015) Region-specific variation in the properties of skeletal adipocytes reveals regulated and constitutive marrow adipose tissues. *Nat Commun* 6:7808 . doi: 10.1038/ncomms8808
8. Akintoye SO, Lam T, Shi S, et al (2006) Skeletal site-specific characterization of orofacial and iliac crest human bone marrow stromal cells in same individuals. *Bone* 38:758–768 . doi: 10.1016/j.bone.2005.10.027
9. Kozloff KM, Volakis LI, Marini JC, Caird MS (2010) Near-infrared fluorescent probe traces bisphosphonate delivery and retention in vivo. *J Bone Miner Res* 25:1748–1758 . doi: 10.1002/jbmr.66
10. Yamada M, Matsuzaka T, Uetani M, et al (1995) Normal age-related conversion of bone marrow in the mandible: MR imaging findings. *Am J Roentgenol* 165:1223–1228 . doi: 10.2214/ajr.165.5.7572508
11. Fazeli PK, Horowitz MC, MacDougald OA, et al (2013) Marrow Fat and Bone—New Perspectives. *J Clin Endocrinol Metab* 98:935–945 . doi: 10.1210/jc.2012-3634
12. Hardouin P, Rharass T, Lucas S (2016) Bone Marrow Adipose Tissue: To Be or Not To Be a Typical Adipose Tissue? *Front Endocrinol* 7: . doi: 10.3389/fendo.2016.00085
13. Lips P, van Ginkel FC, Netelenbos JC (1985) Bone marrow and bone remodeling. *Bone* 6:343–344
14. Schwartz AV (2015) Marrow fat and bone: review of clinical findings. *Bone Res* 6:40 . doi: 10.3389/fendo.2015.00040

15. Patsch JM, Li X, Baum T, et al (2013) Bone marrow fat composition as a novel imaging biomarker in postmenopausal women with prevalent fragility fractures. *J Bone Miner Res* 28:1721–1728 . doi: 10.1002/jbmr.1950
16. Devlin MJ (2013) Bone marrow composition, diabetes, and fracture risk: More bad news for saturated fat. *J Bone Miner Res* 28:1718–1720 . doi: 10.1002/jbmr.2013
17. Paccou J, Hardouin P, Cotten A, et al (2015) The Role of Bone Marrow Fat in Skeletal Health: Usefulness and Perspectives for Clinicians. *J Clin Endocrinol Metab* 100:3613–3621 . doi: 10.1210/jc.2015-2338
18. Pino AM, Miranda M, Figueroa C, et al (2016) Qualitative Aspects of Bone Marrow Adiposity in Osteoporosis. *Front Endocrinol* 7: . doi: 10.3389/fendo.2016.00139
19. Yeung DKW, Griffith JF, Antonio GE, et al (2005) Osteoporosis is associated with increased marrow fat content and decreased marrow fat unsaturation: A proton MR spectroscopy study. *J Magn Reson Imaging* 22:279–285 . doi: 10.1002/jmri.20367
20. Naveiras O, Nardi V, Wenzel PL, et al (2009) Bone-marrow adipocytes as negative regulators of the haematopoietic microenvironment. *Nature* 460:259–263 . doi: 10.1038/nature08099
21. Scheller EL, Cawthorn WP, Burr AA, et al (2016) Marrow Adipose Tissue: Trimming the Fat. *Trends Endocrinol Metab* 27:392–403 . doi: 10.1016/j.tem.2016.03.016
22. Justesen J, Stenderup K, Ebbesen EN, et al (2001) Adipocyte tissue volume in bone marrow is increased with aging and in patients with osteoporosis. *Biogerontology* 2:165–171
23. During A, Penel G, Hardouin P (2015) Understanding the local actions of lipids in bone physiology. *Prog Lipid Res* 59:126–146 . doi: 10.1016/j.plipres.2015.06.002
24. Mödder UI, Khosla S (2008) Skeletal stem/osteoprogenitor cells: Current concepts, alternate hypotheses, and relationship to the bone remodeling compartment. *J Cell Biochem* 103:393–400 . doi: 10.1002/jcb.21423
25. Clabaut A, Delplace S, Chauveau C, et al (2010) Human osteoblasts derived from mesenchymal stem cells express adipogenic markers upon coculture with bone marrow adipocytes. *Differentiation* 80:40–45 . doi: 10.1016/j.diff.2010.04.004
26. Li M, Shen Y, Qi H, Wronski TJ (1996) Comparative study of skeletal response to estrogen depletion at red and yellow marrow sites in rats. *Anat Rec* 245:472–480 . doi: 10.1002/(SICI)1097-0185(199607)245:3<472::AID-AR3>3.0.CO;2-U
27. Du Z, Steck R, Doan N, et al (2014) Estrogen deficiency associated bone loss in the maxilla: a methodology to quantify the changes in the maxillary intra-radicular alveolar bone in an ovariectomized rat osteoporosis model. *Tissue Eng Part C Methods* 141015001219004 . doi: 10.1089/ten.TEC.2014.0268
28. Jiao K, Dai J, Wang M-Q, et al (2010) Age- and sex-related changes of mandibular condylar cartilage and subchondral bone: A histomorphometric and micro-CT study in rats. *Arch Oral Biol* 55:155–163 . doi: 10.1016/j.archoralbio.2009.11.012

43. Mavropoulos A, Ödman A, Ammann P, Kiliaridis S (2010) Rehabilitation of masticatory function improves the alveolar bone architecture of the mandible in adult rats. *Bone* 47:687–692 . doi: 10.1016/j.bone.2010.06.025
44. Allen MR (2011) The effects of bisphosphonates on jaw bone remodeling, tissue properties, and extraction healing. *Odontology* 99:8–17 . doi: 10.1007/s10266-010-0153-0
45. Kozloff KM, Volakis LI, Marini JC, Caird MS (2010) Near-infrared fluorescent probe traces bisphosphonate delivery and retention in vivo. *J Bone Miner Res* 25:1748–1758 . doi: 10.1002/jbmr.66
46. Choi DY, Sun KH, Won SY, et al (2012) Trabecular bone ratio of the mandibular condyle according to the presence of teeth: a micro-CT study. *Surg Radiol Anat* 34:519–526 . doi: 10.1007/s00276-012-0943-x
47. Eijden TMGJ van, Helm PN van der, Ruijven LJ van, Mulder L (2006) Structural and Mechanical Properties of Mandibular Condylar Bone. *J Dent Res* 85:33–37 . doi: 10.1177/154405910608500105
48. Bresin A, Kiliaridis S, Strid K-G (1999) Effect of masticatory function on the internal bone structure in the mandible of the growing rat. *Eur J Oral Sci* 107:35–44 . doi: 10.1046/j.0909-8836.1999.eos107107.x
49. Chappard D, Pascaretti-Grizon F, Gallois Y, et al (2006) Medullar fat influences texture analysis of trabecular microarchitecture on X-ray radiographs. *Eur J Radiol* 58:404–410 . doi: 10.1016/j.ejrad.2005.12.033
50. Di Iorgi N, Rosol M, Mittelman SD, Gilsanz V (2008) Reciprocal Relation between Marrow Adiposity and the Amount of Bone in the Axial and Appendicular Skeleton of Young Adults. *J Clin Endocrinol Metab* 93:2281–2286 . doi: 10.1210/jc.2007-2691

Microarchitecture osseuse et adiposité médullaire de la mandibule : Etude expérimentale chez la ratte adulte ovariectomisée.

COUTEL Xavier – 121 p. ; 36 ill. ; 246 réf.

Mots clés : Mandibule ; Microarchitecture osseuse ; Adiposité médullaire ; Marquage au tétr oxyde d'osmium ; Microtomographie à RX.

Résumé :

L'ostéoporose est une maladie fréquente et généralisée du squelette qui se caractérise par une perte de masse osseuse et des altérations de la structure des os. Ces variations des propriétés osseuses, observées à diverses échelles et associées à une augmentation du contenu adipeux de la moelle, témoignent d'une plus grande fragilité du squelette. Ces modifications sont cependant différentes en fonction du site. Cette variation du contenu adipeux médullaire, rapportée notamment dans les os longs du squelette appendiculaire, semble jouer un rôle crucial dans la survenue de l'ostéoporose. Néanmoins, ces altérations ostéo-médullaires, aussi bien quantitatives que qualitatives, sont controversées et peu documentées au niveau des maxillaires, la mandibule en particulier. Le but de notre étude est d'évaluer, au cours du vieillissement et dans un modèle d'ostéoporose (ratte adulte ovariectomisée), les relations entre les variations du contenu adipeux médullaire et la microarchitecture osseuse en site mandibulaire en comparaison avec un site de référence, le tibia. La microarchitecture osseuse, la quantité et la répartition du contenu adipeux médullaire après marquage au tétr oxyde d'osmium ont été analysées par microtomographie à rayons X dans la mandibule dentée (os alvéolaire) et non dentée (condyle). Au cours du vieillissement, aucune altération des paramètres osseux et médullaires n'a été mise en évidence. En revanche, le déficit hormonal en oestrogènes induit par ovariectomie conduit à une perte osseuse plus marquée (+35%) dans le tibia que dans la mandibule, associée à des modifications microarchitecturales et adipeuses médullaires site-spécifiques. En effet, en comparaison avec le tibia, un faible contenu adipeux (<10% de moelle) est retrouvé dans le secteur denté (alvéolaire) ainsi que non denté (condyle). A la différence du tibia, au sein duquel un effet de « clustering » des adipocytes est observé à la surface osseuse trabéculaire, le contenu adipeux mandibulaire est réparti de manière homogène dans les espaces médullaires avec très peu de contact avec la surface osseuse trabéculaire. En conclusion, nos résultats indiquent une perte osseuse modérée dans la mandibule par rapport au tibia associée à une augmentation du contenu adipeux médullaire tardive dont la répartition au sein des espaces médullaires n'est pas modifiée à la différence du tibia. Nous émettons l'hypothèse qu'une activité de remodelage et des sollicitations biomécaniques différentes puissent expliquer les spécificités physiopathologiques observées en site mandibulaire. D'autres études seront nécessaires pour préciser l'impact de telles modifications sur la qualité osseuse à l'échelle moléculaire et élémentaire, ainsi que pour préciser les mécanismes de dialogues entre les ostéoblastes et les adipocytes.

JURY :

Présidente : Madame le Professeur Ariane BERDAL
Rapporteurs : Madame le Professeur Marie-Hélène LAFAGE-PROUST
Monsieur le Professeur Philippe LESCLOUS
Examineur : Monsieur le Professeur Julien PACCOU
Directeur de thèse : Monsieur le Professeur Guillaume PENEL
Co-directrice de thèse : Madame le Docteur Cécile OLEJNIK

Laboratoire : Physiopathologie des Maladies Osseuses Inflammatoires
PMOI – EA 4490, Faculté de Chirurgie Dentaire, Place de Verdun, 59000 Lille

LILLE

COUDEL X.

MICROARCHITECTURE OSSEUSE ET ADIPOSITE MEDULLAIRE DE LA MANDIBULE :
Etude expérimentale chez la ratte adulte ovariectomisée

2018
