



HAL
open science

Rôle des ostéocytes dans la perte osseuse d'immobilisation : préparation du vol spatial Bion M2

Laura Peuriere

► **To cite this version:**

Laura Peuriere. Rôle des ostéocytes dans la perte osseuse d'immobilisation : préparation du vol spatial Bion M2. Biologie cellulaire. Université de Lyon, 2021. Français. NNT : 2021LYSES009 . tel-03714326

HAL Id: tel-03714326

<https://theses.hal.science/tel-03714326>

Submitted on 5 Jul 2022

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

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



N° d'ordre NNT : 2021LYSES009

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON

opérée au sein de
l'Université Jean Monnet Saint-Etienne
INSERM U1059 – SAINBIOSE
Laboratoire de Biologie des Tissus Ostéo-articulaires (LBTO)

Ecole Doctorale n°488
Sciences Ingénierie Santé – EDSIS 488

Spécialité de doctorat : Biologie, Médecine, Santé
Discipline : Biologie Moléculaire et Cellulaire

Soutenue publiquement le 12/02/2021, par :
Laura Peurière

Rôle des ostéocytes dans la perte osseuse d'immobilisation : préparation du vol spatial Bion M2

Devant le jury composé de :

Présidente

LAFAGE-PROUST, Marie-Hélène, Professeure, INSERM U1059 - SAINBIOSE, LBTO, Université Jean-Monnet de Saint-Etienne

Rapporteurs

GEOFFROY, Valérie - PhD, DR2 INSERM - INSERM UMR 1229, RMeS, Université de Nantes
COURTEIX, Daniel - Professeur émérite - AME2P, Université Clermont-Auvergne

Examinatrice

GERBAIX, Maude - PhD, Service des maladies osseuses, Université de Genève

Directrice de thèse

VICO, Laurence - PhD, DR1 INSERM - INSERM U1059 - SAINBIOSE, LBTO, Université Jean-Monnet de Saint-Etienne

Remerciements

Je remercie tout d'abord Dr. Valérie Geoffroy et Pr. Daniel Courteix pour avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse.

Je tiens à remercier tout particulièrement ma directrice de thèse Dr. Laurence VICO pour m'avoir offert la possibilité d'effectuer cette thèse mais également pour son accompagnement et ses encouragements tout au long de ces trois années.

Un remerciement spécial pour Carmelo Mastrandrea, qui a été mon binôme de recherche durant deux ans de cette thèse et qui m'a initié à de nombreuses techniques et expérimentations.

Je remercie la Pr. Marie-Hélène Lafage-Proust pour sa participation dans mon travail de recherche ainsi que ses excellents conseils.

Merci à tous les doctorants et stagiaires du LBTO que j'ai pu côtoyer durant ces 3 ans pour leur sympathie et leur bonne humeur. Je tiens à remercier spécialement Robin Caire et Mathieu Maalouf, pour les nombreuses conversations et entraides sur nos travaux respectifs, mais également pour leur amitié (et leur folie...). Encore merci à toi Mathieu, qui m'a permis d'avancer plus rapidement dans certaines expérimentations suite au confinement. Peut-être que d'ici ta soutenance de thèse, tes blagues seront enfin devenues drôles.

Je tiens à remercier Marie-Thérèse Linossier et Mireille Paul pour leurs importantes contributions dans le travail d'analyses moléculaires, mais aussi pour leur gentillesse et leur sympathie.

Je remercie également Arnaud Vanden-Bossche pour sa contribution au travail de transparenisation du tissu osseux et des marquages ostéocytaires.

Je remercie chacun des membres du LBTO qui ont pu m'aider de près ou de loin dans mon travail mais également pour leur accueil et leur sympathie.

Pour finir, je remercie l'Institut de Médecine et de Physiologie Spatiales (MEDES) pour le financement de cette thèse.

Sommaire Manuscrit

Introduction générale.....	1
Introduction	3
1. Le tissu osseux	4
2. Adaptation de l'os à la contrainte mécanique	10
3. Les ostéocytes et la mécanotransduction.....	12
4. La perte osseuse chez les astronautes.....	19
5. Le modèle murin de suspension anti-orthostatique	28
6. Rôles des ostéocytes dans la perte osseuse d'immobilisation	31
7. Métabolisme, température et perte osseuse.....	37
Sommaire et objectifs de recherche.....	42
Matériel et méthode	43
1. Expérimentation animale.....	44
2. Modèle murin de suspension (HLU).....	48
3. Analyses tomographiques (μ CT)	51
4. Analyses histomorphométriques	54
5. Analyses de la BMAT par marquage osmium	58
6. Analyses moléculaires.....	59
7. Dosages ELISA.....	60
8. Analyses de la densité ostéocytaire et des lacunes vides	61
9. Analyses du réseau lacuno-canaliculaire et ostéocytaire.....	63
Résultats	67
Préambule.....	68
Papier 1 – HINDLIMB UNLOADING IN C57BL/6 MICE INDUCES BONE LOSS AT THERMONEUTRALITY WITHOUT ANY CHANGE IN OSTEOCYTE AND LACUNO-CANALICULAR NETWORK	69
Papier 2 – HINDLIMB UNLOADING-INDUCED BONE LOSS BEARS NO RELATIONSHIP WITH BONE MARROW ADIPOSE TISSUE IN THERMONEUTRAL CONDITION	93
Conclusions et perspectives	115
Bibliographie	123
Annexes méthodologiques	137
Annexes - communications	195

Abréviations

μCT : micro Computed Tomography

aBMD : area Bone Mineral Density

ADN : Acide Désoxyribonucléique

AO : Apoptose Ostéocytaire

aRED : advanced Resistive Exercise Device

ARN : Acide Ribonucléique

ATP : Adénosine Triphosphate

BFR : Bone Formation Rate

BMAT : Bone Marrow Adipose Tissue

BMC : Bone Mineral Content

BMP : Bone Morphogenetic Protein

BV/TV : Bone Volume/Total Volume

cDNA: ADN complémentaire

Conn.D : Connectivity Density

CONT : Contrôles

CSH : Cellule Souche Hématopoïétique

CSM : Cellules Souches Mésenchymateuses

Ct.Ar : Cortical cross-sectional Area

Ct.Th : Cortical Thickness

CTX-I : C-terminal cross-linked telopeptide of type I collagen

DEE/BMR : Daily Energy Expenditure/Basal Metabolic Rate

Dkk1: Dickkopf WNT signaling pathway inhibitor 1

dLS/BS : double Labeled Surface/Bone Surface

DMP1 : Dentin Matrix acidic Phosphoprotein1

DMSO : Diméthyl Sulfoxyde

EDTA : Ethylenediaminetetraacetic Acid

ELISA : Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

FGF: Fibroblast Growth Factor

HLU : Hindlimb Unloading

IGF-1 : Insulin-like Growth Factor 1

ISEL : In Situ End-Labeling

ISS : International Space Station

LCN : Lacune/Lacuno-canaliculaire

MAR : Mineral Apposition Rate

M-CSF : Macrophage Colony-Stimulating Factor

Md.Ar : Medullary Area

MEC : Matrice Extracellulaire

MEPE : Matrix Extracellular Phosphoglycoprotein

MMA : Méthylméthacrylate

MMP : Metalloproteinase

MO : Moelle Osseuse

Nano-CT : nano Computed Tomography

NO : Nitric Oxide

NTX-I : N-terminal cross-linked telopeptide of type I collagen

Oc.S/BS : Osteoclastic Surface/Bone Surface

OPG : Ostéoprotégérine

OsO4 : Tétroxyde d'osmium

P1CP : C-terminal propeptide of type 1 procollagen

P1NP : N-terminal propeptide of type 1 procollagen

PAL : Alcaline phosphatase

PBS : Phosphate Buffered Saline

PFA : Paraformaldehyde

PHEX : Phosphate-regulating neutral endopeptidase homolog X-Linked

PLC : Péri-lacuno-canaliculaire

PLR : Peri-Lacuno-canalicular Remodeling

PPAR γ : Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma

pQCT : peripheral Quantitative Computed Tomography

PTH : Parathyroïd Hormone

RANKL : Receptor Activator of Nuclear factor Kappa-B Ligand

ROI : Region Of Interest

RT-PCR : Real-Time Polymerase Chain Reaction

Runx2 : Runt-related transcription factor 2

SOST: Sclérostine

TA : Tissu Adipeux

T_a : Température ambiante

Tb.N : Trabecular Number

Tb.Sp : Trabecular Spacing

Tb.Th : Trabecular Thickness

TGF : Transforming Growth Factor

TRAP : Tartrate Resistant Acid Phosphatase

TUNEL : deoxynucleotidyl Transferase dUTP Nick End Labelling

UCP-1 : Uncoupling protein 1

vBMD : volumetric Bone Mineral Density

VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor

Introduction générale

Dès que les humains ont commencé à s'aventurer dans l'espace, des chercheurs ont voulu évaluer les effets physiologiques des vols spatiaux sur le corps humain. L'investissement économique que représente ces recherches est depuis régulièrement remis en cause du fait qu'elles n'auraient pour seul objectif d'obtenir les connaissances nécessaires au maintien de la santé des astronautes, avec peu ou sans retour scientifique fondamental sur Terre. Bien que les recherches soient essentiellement concentrées sur la santé des astronautes, de nombreuses découvertes ont eu un impact important dans la compréhension des sciences fondamentales, notamment le rôle de la gravité dans le développement et la physiologie humaine. L'environnement extrême et incomparable que constitue l'espace offre des possibilités de recherche précieuses et uniques, puisqu'il est impossible à reproduire sur Terre. De plus, les vols spatiaux représentent un environnement d'expérimentation très intéressant puisqu'il est hautement contrôlé et les astronautes sont en permanence monitorés. La vie dans l'espace, et donc en microgravité, a apporté de nombreux apports scientifiques dans plusieurs domaines physiologiques, comme l'étude des fonctions sensorimotrices et vestibulaires dans la perception et l'orientation dans l'espace, de la pression vasculaire, la perte musculaire, mais également la perte osseuse.

En effet, l'os présente une réponse adaptative à la contrainte mécanique, nommée méchanostat. Le tissu osseux contient en effet des cellules capables de ressentir les contraintes mécaniques, les ostéocytes. En présence d'une augmentation du niveau de contrainte mécanique sur le tissu osseux, comme par exemple en pratiquant une activité physique, les ostéocytes envoient des signaux biochimiques aux ostéoblastes qui vont alors former davantage de tissu osseux, afin d'éviter de possibles fractures. A l'inverse, lorsque le niveau de contrainte mécanique sur le tissu osseux diminue, comme par exemple lors d'un alitement prolongé, les ostéocytes envoient des signaux biochimiques aux ostéoclastes afin de résorber de l'os, qui se relève alors inutile à l'équilibre du squelette. Sur Terre, le squelette humain supporte en permanence le poids du corps contre la gravité terrestre. C'est pourquoi dans l'espace, en condition de microgravité, les astronautes subissent une perte osseuse rapide et importante, plus particulièrement au niveau des os porteurs. Certaines dégradations osseuses observées en 4 à 6 mois de vol spatial sont 4 fois plus importantes que celles observées en 2 ans chez des femmes ménopausées et ostéoporotiques (Burghardt et al. 2010). De plus, une fois revenus sur Terre, les astronautes ne présentent qu'une récupération très modeste de leur masse et résistance osseuse au niveau des os porteurs, mais également une dégradation soudaine des os non porteurs (*p.ex* radius) qui n'a pas lieu lors du vol spatial (Vico et al. 2017). Le système méchanostat semble donc être dysfonctionnel, et suggère une altération de la fonction ostéocytaire. En 2013, dans le cadre de la mission Americano-Russe Bion M1, 10 souris ont été envoyés dans l'espace pour une durée d'un mois. L'analyse des fémurs ont mis en évidence une diminution de la densité ostéocytaire, suggérant un possible rôle de l'apoptose

des ostéocytes dans le dérèglement du méchanostat et l'absence de récupération chez les astronautes (Gerbaix et al. 2017).

L'atrophie du système musculo-squelettique chez les astronautes représentent une des problématiques majeures à résoudre afin d'envisager des vols spatiaux à long-terme. Cependant, l'étude du déconditionnement osseux dans l'espace a également beaucoup à apporter au déconditionnement osseux sur Terre. En effet, de nombreuses situations mènent à un déconditionnement osseux important telles que le vieillissement, l'immobilisation, un style de vie sédentaire ou encore certaines maladies chroniques (*p.ex* obésité, diabète). Ce déconditionnement se caractérise par une diminution de la masse osseuse et une détérioration de la microarchitecture du tissu osseux, constituant un facteur de risque majeur de fractures. Les affections musculo-squelettiques représentent une lourde charge pour les individus mais également pour le système de santé. Les affections musculo-squelettiques sont également la principale cause de douleur à long terme et d'handicap physique, et affectent des centaines de millions de personnes autour du monde. La population à travers le monde étant de plus en plus vieillissante, et nos styles de vie de plus en plus sédentaires, le déconditionnement osseux représente un enjeu majeur dans la médecine actuelle.

Introduction

1. Le tissu osseux	4
1.1 Anatomie osseuse.....	4
1.2 Composition cellulaire du tissu osseux	6
1.3 Composition matricielle du tissu osseux.....	7
1.4 Physiologie osseuse.....	7
2. Adaptation de l'os à la contrainte mécanique	10
3. Les ostéocytes et la mécanotransduction.....	12
3.1 Les ostéocytes contrôlent le remodelage osseux.....	14
3.2 Les ostéocytes sont des mécanosenseurs	14
3.3 Mécanismes de la mécanosensibilité ostéocytaire	15
3.4 Les ostéocytes et le métabolisme minéral.....	17
4. La perte osseuse chez les astronautes.....	19
4.1 Evolution du système squelettique lors d'un vol spatial	19
4.2 Evolution du système squelettique après retour sur Terre	22
4.3 Contre-mesures	25
5. Le modèle murin de suspension anti-orthostatique.....	28
5.1 Effet de l'HLU sur les paramètres architecturaux osseux.....	29
5.2 Effet de l'HLU sur l'activité cellulaire osseuse	30
5.3 Comparaison avec la perte osseuse spatiale murine.....	30
6. Rôles des ostéocytes dans la perte osseuse d'immobilisation.....	31
6.1 Messagers chimiques ostéocytaires dans la perte osseuse d'immobilisation.....	31
6.2 La mort ostéocytaire dans la perte osseuse d'immobilisation.....	31
7. Métabolisme, température et perte osseuse.....	37
7.1 Le tissu adipeux médullaire et le tissu osseux.....	37
7.2 Température et souris, une question de thermoneutralité	38
Sommaire et objectifs de recherche	42

1. Le tissu osseux

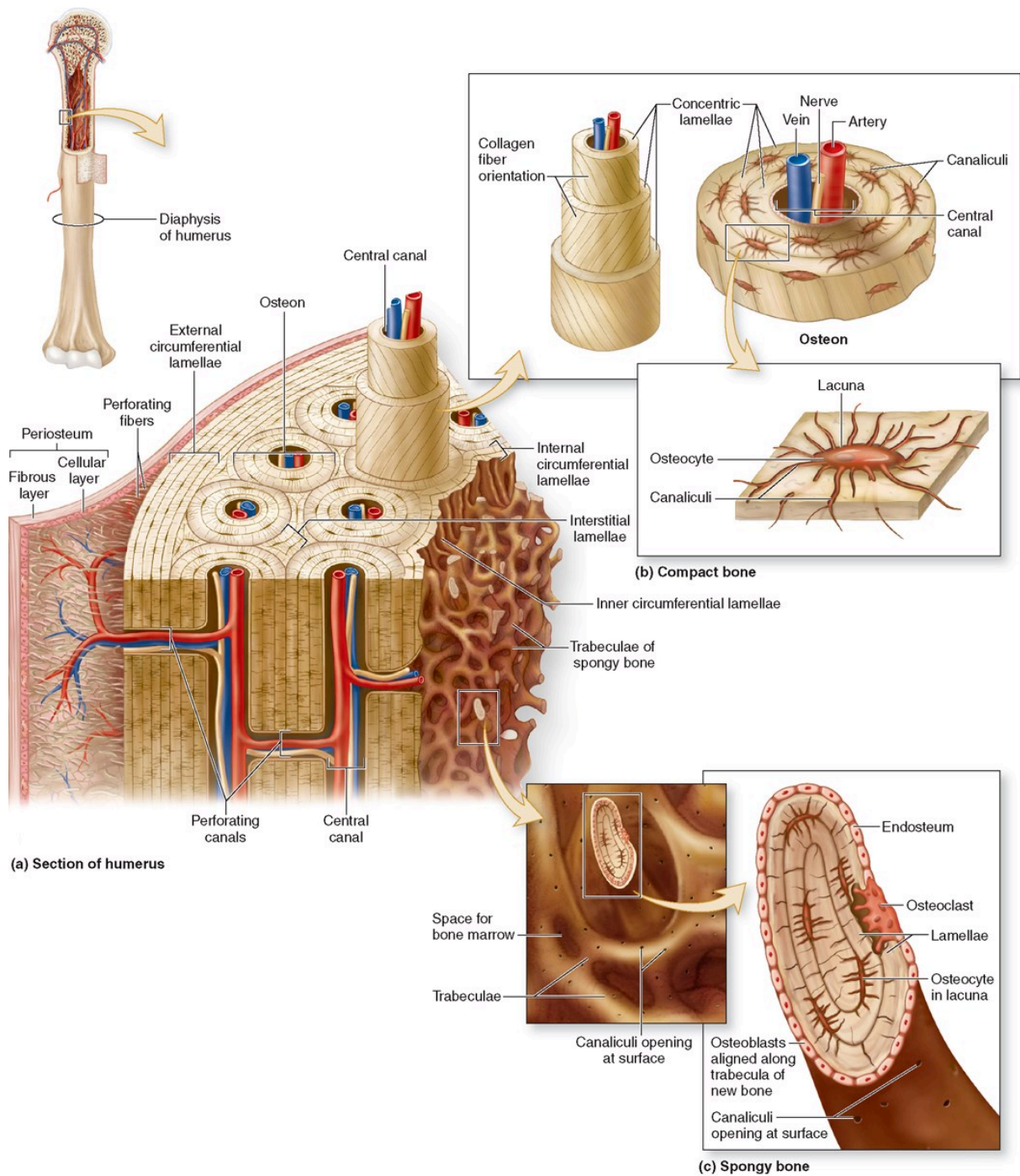
Le système squelettique, composé de 213 os chez l'humain adulte, remplit plusieurs rôles :

- **Mécanique** : le squelette soutient le corps et protège les organes internes, il est également à la base de la locomotion.
- **Métabolique** : le squelette constitue la principale réserve de l'organisme en minéraux, notamment en calcium et phosphore.
- **Hématopoïétique** : les os contiennent la moelle osseuse, site de l'hématopoïèse.
- **Endocrinien** : le tissu osseux sécrète de nombreuses hormones et facteurs de croissance, participant notamment à l'équilibre phospho-calcique et au métabolisme glucidique.

1.1 Anatomie osseuse

Il existe trois grands types d'os : les os plats (*p. ex* la calvaria), les os courts (*p. ex* le carpe du poignet) et les os longs (*p. ex* le fémur). Les os longs présentent 3 régions anatomiques distinctes : la diaphyse, la métaphyse et l'épiphyse. Le tissu osseux s'organise structurellement sous forme de cortex (*c.-à-d* os cortical) ou sous forme de trabécules (*c.-à-d* os trabéculaire). L'os cortical représente 80% du tissu osseux, il constitue une enveloppe résistante composée par la juxtaposition d'ostéons cylindriques (*c.-à-d* lamelles concentriques). L'os est parcouru par des canaux de Havers et de Wolkmann qui contiennent des vaisseaux sanguins et lymphatiques, parfois des nerfs, et qui assurent une communication entre l'espace médullaire contenant la moelle osseuse et le périoste. L'os cortical est dense et présente une faible porosité ce qui lui confère une grande résistance mécanique. L'os trabéculaire, compose 20% du tissu osseux et se situent au sein de la cavité médullaire au niveau des épiphyses et métaphyses. Il est structuré sous forme d'un réseau de plaques et de cylindres appelés trabécules. L'os trabéculaire est richement vascularisé via des sinusoides et sa structure lui confère une grande aire de surface en contact direct avec la moelle osseuse. Peu résistant à la contrainte mécanique, l'os trabéculaire a davantage un rôle métabolique. Le périoste et l'endoste, sont des membranes conjonctives qui recouvrent respectivement la surface externe et interne de l'os. Ces membranes sont vascularisées et contiennent les cellules osseuses qui vont résorber ou former du tissu osseux (Fig.1).

Histologiquement, le tissu osseux peut être tissé (*c.-à-d* os primaire) ou organisé par exemple en os lamellaire chez l'humain (*c.-à-d* os secondaire). L'os primaire est le premier tissu osseux formé, il constitue le squelette embryonnaire et est progressivement remplacé par l'os secondaire lors de la croissance jusqu'à disparaître chez l'humain adulte, hormis lors de réparation de fractures. L'os primaire est caractérisé par un pattern désorganisé et irrégulier des fibres de collagènes et de la minéralisation, c'est un tissu flexible mais peu résistant. L'os lamellaire présente quant à lui des fibres de collagènes hautement organisées et compactées sous forme de feuillets, ce qui rend ce tissu rigide mais résistant.



Source: Mescher AL: *Junqueira's Basic Histology*, 13th Edition: www.accessmedicine.com
 Copyright © The McGraw-Hill Companies, Inc. All rights reserved.

Figure 1 : Anatomie macroscopique et microscopique d'un os long. D'après Mescher (2013).

1.2 Composition cellulaire du tissu osseux

Les ostéoclastes et la résorption osseuse

Les ostéoclastes représentent 1% des cellules osseuses. Ce sont de larges cellules multinucléées provenant de la différenciation des cellules souches hématopoïétiques (CSH) de la moelle osseuse. La différenciation ostéoclastique est initiée par le facteur M-CSF (*c.-à-d Macrophage Colony-Stimulating Factor*) mais elle est également régulée dans un second temps par les facteurs RANKL (*c.-à-d Receptor Activator of Nuclear factor Kappa-B Ligand*) et OPG (*c.-à-d ostéoprotégérine*) qui jouent respectivement un rôle activateur et inhibiteur. Les ostéoclastes sont les cellules osseuses qui résorbent le tissu osseux, elles reposent sur la surface au sein de lacunes de Howship (*c.-à-d lacunes de résorption*). Elles se lient à la matrice via des podosomes puis la solubilisent en déversant des enzymes protéolytiques telles que la cathepsine K et la TRAP (*c.-à-d Tartrate-Resistant Acid Phosphatase*) ainsi que des ions H⁺. La matrice alors dissolue libère du calcium et du phosphore ainsi que des produits de dégradation du collagène tels que CTX-I (*c.-à-d carboxy-terminal collagen crosslinks*) et NTX-I (*c.-à-d amino-terminal collagen crosslinks*) qui seront endocytés par l'ostéoclaste puis sécrétés dans la circulation sanguine. Une fois la résorption effectuée, l'ostéoclaste meurt. L'activité ostéoclastique est essentiellement régulée par RANKL et OPG.

Les ostéoblastes et la formation osseuse

Les ostéoblastes représentent 5% des cellules osseuses. Ils proviennent de la différenciation de cellules souches mésenchymateuses (CSM) dans la moelle osseuse ou des péricytes situés à la périphérie des vaisseaux, sous l'influence des facteurs de transcription Runx2 (*c.-à-d Runt-related transcription factor 2*) et Osterix. Les ostéoblastes sont des cellules qui tapissent la surface osseuse et forment du tissu osseux par synthèse et sécrétion de collagène de type I, puis par libération de phosphate via l'enzyme alcaline phosphatase (PAL), formant des cristaux d'hydroxyapatite en interagissant avec le calcium présent localement. Lorsqu'un ostéoblaste activé a terminé de synthétiser la matrice osseuse, il peut revenir à un état de quiescence (*c.-à-d cellule bordante*), se différencier en ostéocyte, ou entrer dans la voie apoptotique. Les ostéoblastes sont capables de sécréter les facteurs RANKL et OPG contrôlant la différenciation et l'activité des ostéoclastes. La différenciation et l'activité ostéoblastique sont principalement contrôlées par la molécule ostéocytaire inhibitrice sclérostine (SOST).

Les ostéocytes et le contrôle du remodelage osseux

Les ostéocytes représentent 90 à 95% des cellules osseuses. Contrairement aux ostéoclastes et aux ostéoblastes qui se situent au niveau des surfaces osseuses, les ostéocytes se situent au sein même

de la matrice osseuse. Ils sont différenciés à partir des ostéoblastes et incorporés dans la matrice lors de la formation osseuse. Les ostéocytes possèdent de longues dendrites qui s'inter-connectent, formant un vaste réseau dans l'ensemble du volume osseux. Les ostéocytes sont considérés comme les mécanosenseurs de l'os ainsi que les orchestrateurs du remodelage osseux par la sécrétion de nombreuses molécules régulatrices de l'activité de résorption et de formation : RANKL, OPG, M-CSF, SOST, Dkk1. La nature et le rôle des ostéocytes seront davantage détaillés dans la partie 3.

1.3 Composition matricielle du tissu osseux

La matrice osseuse est composée d'une matrice minérale (*c.-à-d* inorganique), d'une matrice organique, de lipides et d'eau. La matrice minérale prend la forme de cristaux d'hydroxyapatite de calcium qui confère à l'os sa rigidité et sa résistance aux forces compressives. La matrice osseuse organique constitue la plus grande réserve de l'organisme en calcium, phosphore, magnésium et sodium. Elle est sécrétée par les ostéoblastes et est composée principalement de collagène de type I, mais également de protéoglycanes, glycoprotéines, ainsi que des facteurs de croissance (*p. ex* BMP, TGF- β , interleukines...) qui jouent un rôle important dans l'ostéogenèse, la minéralisation ou le remodelage osseux. La matrice organique donne à l'os sa forme et lui confère ses propriétés d'élasticité et résistance aux forces de tension. Une proportion spécifique entre matrice organique et matrice minérale est nécessaire afin d'assurer un bon équilibre entre rigidité et élasticité de l'os.

1.4 Physiologie osseuse

Croissance, modelage osseux et remodelage osseux

Lors de la croissance, les os longs croissent en longueur par un processus d'ossification endochondrale, c'est-à-dire via un intermédiaire cartilagineux. La croissance radiale a quant à elle lieu par apposition osseuse au niveau du périoste et résorption osseuse au niveau de l'endoste.

Le modelage osseux, correspond à la formation de tissu osseux au niveau d'une aire sans os pré-existant. Il intervient majoritairement lors de la croissance du système squelettique. Chez l'humain, la croissance osseuse se termine à maturité sexuelle. Chez la souris, le pic de masse osseuse est atteint à un âge de 4-6 mois mais une croissance très faible subsiste chez l'adulte (Jilka 2013).

Le remodelage osseux, correspond à l'action couplée dans l'espace et le temps des ostéoclastes (*c.-à-d* résorption) et des ostéoblastes (*c.-à-d* formation) afin de renouveler le tissu osseux pré-existant, sans variation de la forme ou de la masse osseuse (Fig.2). Le remodelage osseux intervient quotidiennement afin d'entretenir le tissu osseux mais également afin de réguler l'homéostasie calcique. Chez l'humain, le taux de renouvellement osseux (*c.-à-d* *bone turnover*) est de 0.1% par jour, et chaque épisode de remodelage nécessite 6 à 9 mois afin d'être complété. Chez la souris, le taux renouvellement

osseux est de l'ordre de 0.7% par jour et chaque épisode de remodelage nécessite 2 semaines afin d'être complété (Jilka 2013).

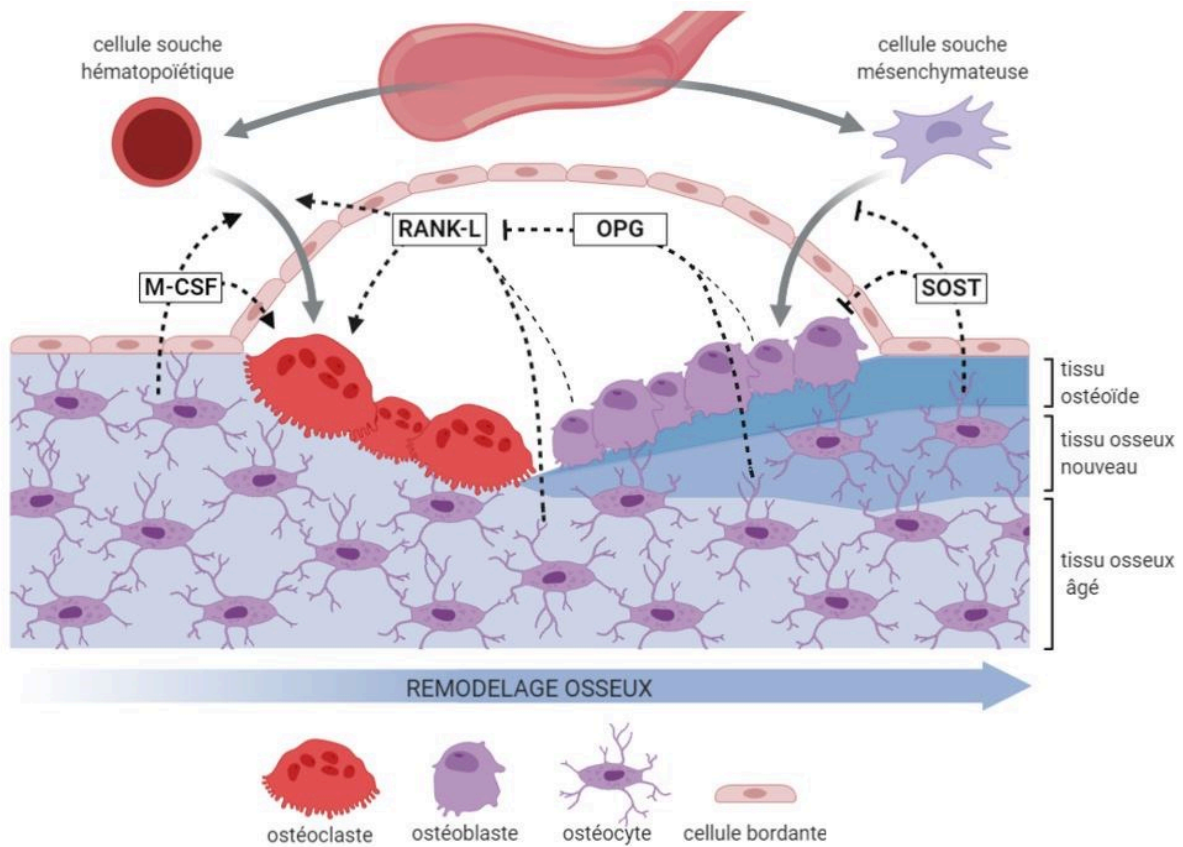


Figure 2 : Illustration du remodelage osseux et de ses voies de signalisation. Représentation personnelle créée avec BioRender.com.

Régulation du remodelage osseux

Les facteurs de croissances tels que les BMPs (*c.-à-d* Bone Morphogenetic Proteins), TGF- β (*c.-à-d* Transforming Growth Factor- β), FGF (*c.-à-d* Fibroblast Growth Factors) et IGF-1 (*c.-à-d* Insulin-like Growth Factor-1) régulent le remodelage osseux de manière locale en favorisant l'activité des ostéoblastes. Le remodelage osseux est également hautement régulé par des facteurs systémiques notamment par les hormones du métabolisme phospho-calcique. La PTH (*c.-à-d* Parathyroid Hormone) et la vitamine D peuvent influencer la sécrétion ostéoblastique de RANKL et M-CSF. La PTH peut également favoriser la différenciation ostéoblastique ce qui lui permet d'influencer soit la formation, soit la résorption osseuse. La calcitonine inhibe la résorption osseuse par action directe sur les ostéoclastes. Les hormones sexuelles, surtout l'estrogène, atténuent l'ostéoclastogenèse et stimule l'apoptose ostéoclastique (Siddiqui et Partridge 2016).

Déconditionnement osseux

L'ostéoporose est une pathologie qui correspond à la diminution et une dégradation de la masse et de l'architecture osseuse, augmentant le risque fracturaire. L'ostéoporose primaire, est un déconditionnement osseux physiologique lié au vieillissement. La diminution du taux d'hormones sexuelles, la diminution de la capacité d'absorption de la vitamine D et du calcium, ainsi qu'une baisse de l'activité physique, augmentent la résorption et diminuent la formation osseuse. L'ostéoporose primaire est bien plus importante chez les femmes que chez les hommes, dû à la diminution drastique du taux d'œstrogène. L'ostéoporose secondaire correspond à une ostéoporose induite par une pathologie ou un traitement. Des maladies génétiques, des déficiences hormonales, le syndrome métabolique ainsi qu'un excès de traitement glucocorticoïdes peuvent mener à un déconditionnement osseux non lié au vieillissement. Cependant, un style de vie sédentaire, l'immobilisation, ou de manière plus extrême, la microgravité, mènent tous à un déconditionnement osseux qui a pour cause des facteurs mécaniques et métaboliques.

2. Adaptation de l'os à la contrainte mécanique

Le squelette a comme premier rôle le soutien du corps. En position debout, il doit supporter en permanence le poids du corps contre la gravité terrestre. En plus de cette charge mécanique quotidienne, le squelette est continuellement exposé à une grande variété de stress mécaniques, d'amplitudes et de fréquences spécifiques. Afin d'obtenir une structure squelettique stable, l'adaptation de la masse et de l'architecture osseuse ainsi que des mécanismes de réparation sont nécessaires. Ce remodelage osseux est corrélé à la magnitude et au taux de contrainte mécanique (Burger et Klein-Nulend 1999). En effet, la masse osseuse va par exemple augmenter au niveau du bras d'un joueur de tennis, alors qu'elle diminue chez les astronautes en condition de microgravité (Bass et al. 2002; Haapasalo et al. 2000; Vico et al. 2000). C'est le principe du mécanostat, décrit par Frost en 1987.

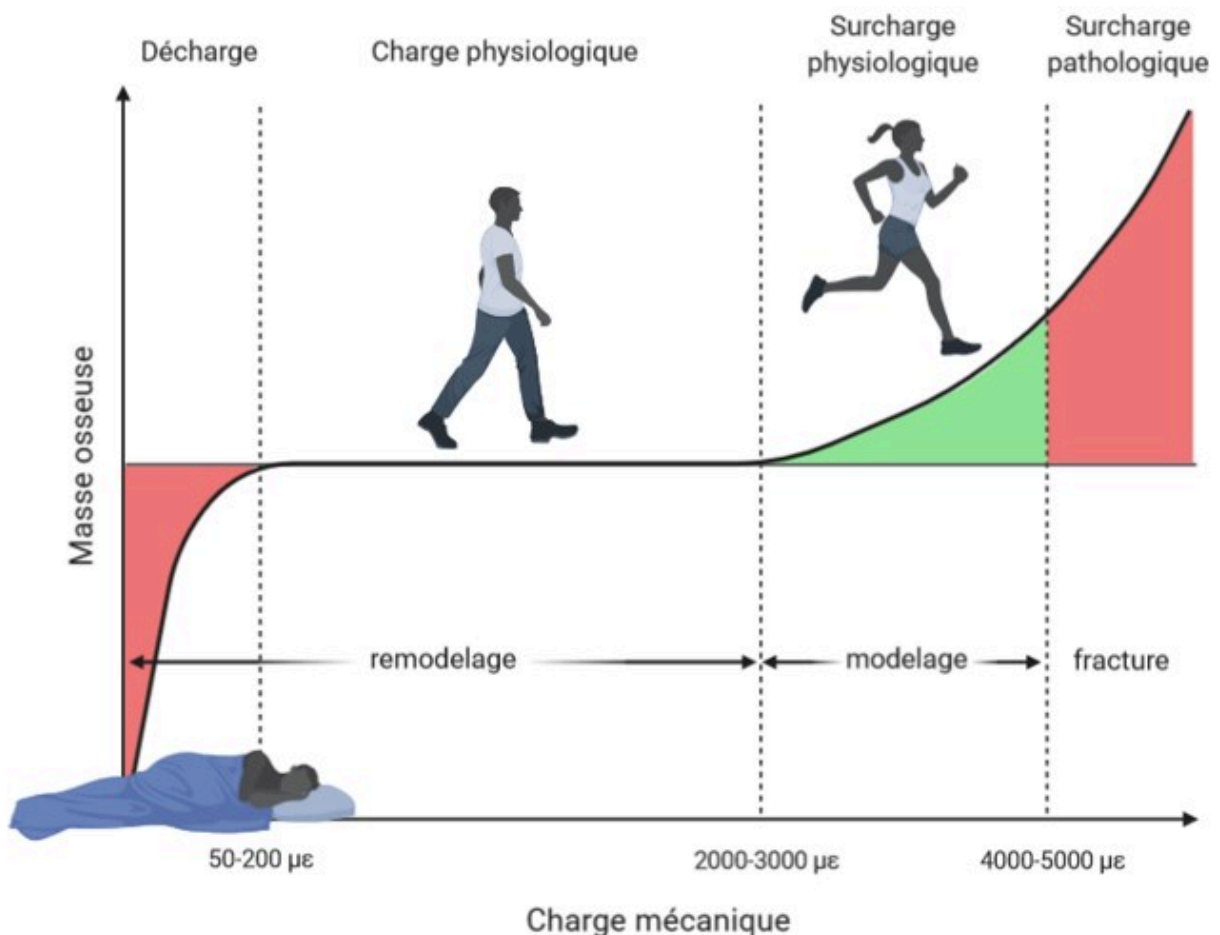


Figure 3 : Illustration de la théorie du mécanostat de Frost. Représentation personnelle créée avec BioRender.com.

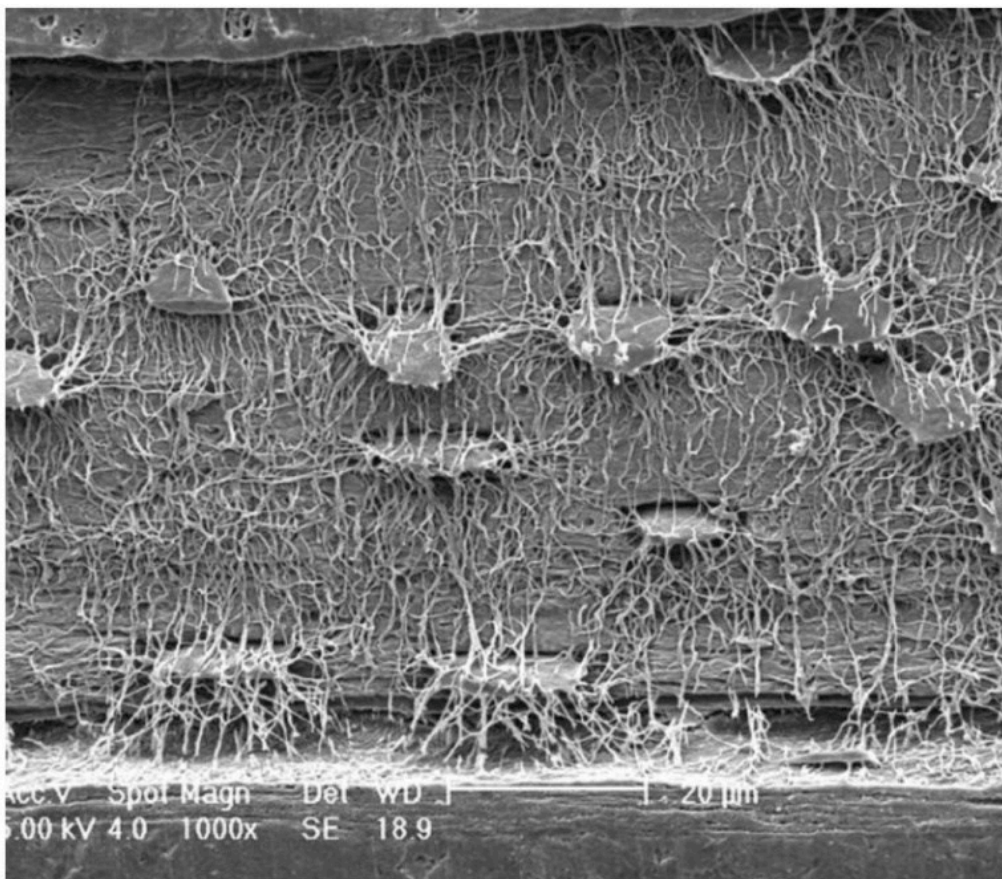
Lorsqu'une contrainte mécanique provoque une déformation tissulaire assez importante pour dépasser un certain seuil (Fig.3, $> 3000\mu\epsilon$), les ostéoblastes vont former davantage d'os (*c.-à-d* modelage osseux) afin d'augmenter la masse et la résistance osseuse et ainsi éviter le risque de fractures. A l'inverse, lorsque le taux de contrainte mécanique est trop faible pour induire une déformation tissulaire (Fig.3, $< 200\mu\epsilon$), les ostéoclastes résorbent de l'os (*c.-à-d* remodelage osseux) qui se révèle alors inutile à l'équilibre du squelette. De cette manière, la masse, l'architecture, et la résistance osseuse sont constamment optimisées par rapport aux contraintes mécaniques auxquelles le squelette est confronté, et avec une quantité économique de matériau. Suite à une phase de formation ou de résorption provoquée par une augmentation ou une diminution des contraintes mécaniques sur le squelette, le tissu osseux retrouve un état stable dans lequel la plage de déformation tissulaire est équilibrée, et où le remodelage osseux intervient seulement de manière physiologique afin d'entretenir le tissu, sans ajout ou diminution de la masse osseuse. Le mécanostat est donc un système rétro-contrôlé. Le niveau d'équilibre du tissu osseux est donc également redéfini en permanence par rapport à un nouvel environnement mécanique.

Ce modèle du mécanostat est influencé par plusieurs variables. Tout d'abord, par la nature de la contrainte mécanique : la magnitude, la fréquence, la direction, la distribution, influencent le mode de déformation tissulaire. L'environnement mécanique est multifactoriel, l'adaptation du squelette résultera des charges les plus exprimées. La sensibilité aux stimuli mécaniques peut également être altérée par le vieillissement et la réponse adaptative de l'os peut être influencée par des facteurs systémiques comme les hormones et la nutrition. La structure et la masse osseuse n'étant pas homogène sur l'ensemble du squelette ni même au sein d'un seul os, chaque os et chaque zone osseuse a son propre seuil de déformation. Pour finir, le mécanostat intervient dans une certaine plage de déformation tissulaire, au-delà de ces limites, on aboutit à des conditions pathologiques, comme par exemple, des fractures (Fig.3).

3. Les ostéocytes et la mécanotransduction

Les ostéocytes constituent 95% de la population cellulaire osseuse. Ce sont des cellules dendritiques situées dans des pores de la matrice osseuse nommées lacunes ou ostéoplastes (Fig.4). La densité ostéocytaire est très élevée, elle est estimée à 19 000- 28 500 par mm^3 dans le squelette humain. Les ostéocytes possèdent de petits corps cellulaires (5-20 μm de diamètre) mais possèdent en moyenne 90 dendrites (Buenzli et Sims 2015) qui s'étendent à travers tout le volume osseux via des canaux nommés canaliculi, on parle de réseau lacuno-canaliculaire (LCN). Les dendrites d'ostéocytes voisins sont inter-connectés via des jonctions gap, formant ainsi un vaste réseau, ou syncytium, dans la matrice osseuse. Ce syncytium communique également avec les vaisseaux sanguins intra et extra-osseux, avec la moelle osseuse, et, les surfaces osseuses où se situent les ostéoblastes et les ostéoclastes.

A



B

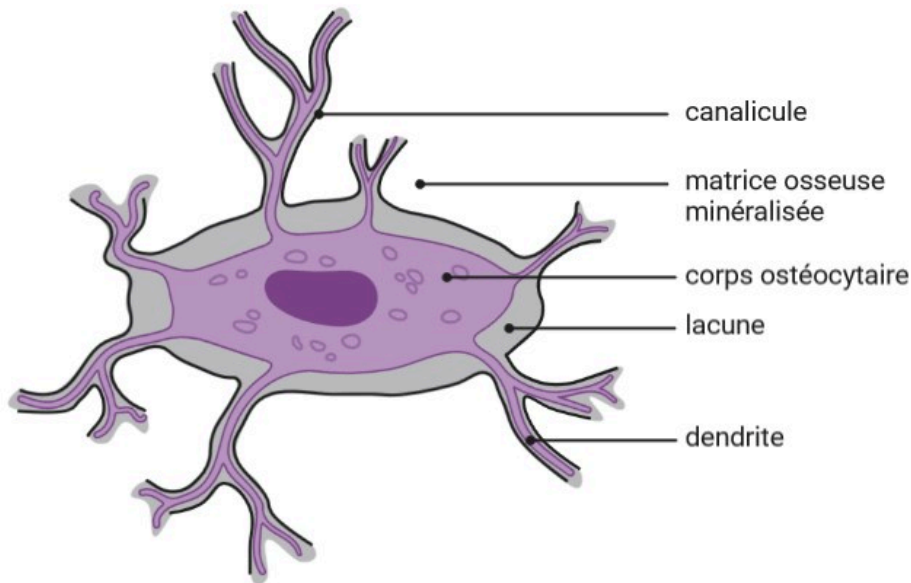


Figure 4 : (A) Réseau ostéocytaire en microscopie électronique. Image fournie par Plotkin, Bellido & Bonewald. D'après Manolagas & Parfitt (2010). **(B) Illustration d'une lacune ostéocytaire.** Représentation personnelle créée avec *BioRender.com*.

Les ostéocytes proviennent de la différenciation des ostéoblastes. En effet, une fois les ostéoblastes activés et après avoir formé de l'os, une sous-population s'emmurent progressivement au sein de la matrice osseuse pas encore minéralisée, grâce à des métalloprotéinases qui clivent le collagène et d'autres protéines de la matrice (Fig.5).

Au sein de l'ostéoïde, l'ostéocyte forme alors des dendrites via la sécrétion de la protéine E11/gp38, ainsi que des connexions via les protéines podoplanine, tubuline, vimentine et actine. L'ostéocyte mature achève progressivement par la suite la minéralisation de la matrice osseuse environnante. On parle d'ostéocytogenèse. Lorsque l'os est entièrement minéralisé, l'ostéocyte peut persister dans sa lacune jusqu'à 10 ans chez l'humain (Marotti, 1987, 1998), mais également rentrer en apoptose ou disparaître dans une lacune de résorption. Ces cellules étant isolées, les nutriments et les déchets transitent seulement via le liquide interstitiel osseux circulant dans l'espace péri-cellulaire, entre les cellules et la matrice osseuse.

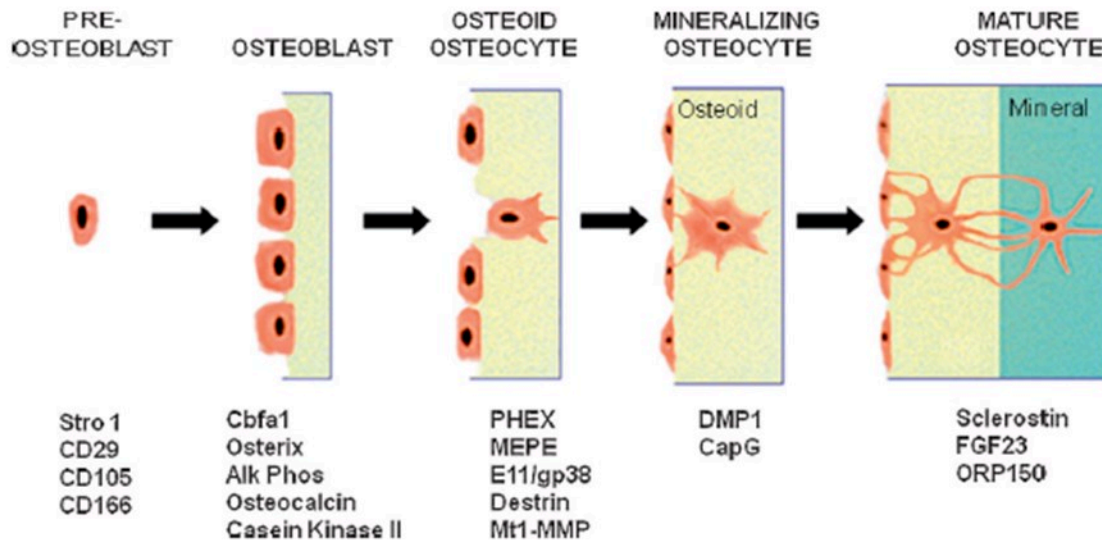


Figure 5 : Marqueurs exprimés lors de l'ostéocytogenèse. D'après Bonewald (2011).

3.1 Les ostéocytes contrôlent le remodelage osseux

Les ostéocytes contrôlent l'activité de résorption via la sécrétion de différentes molécules. La différenciation et l'activité des ostéoclastes sont activées par la sécrétion ostéocytaire de RANKL et M-CSF. Les ostéocytes sécrètent également de l'ostéoprotégérine (OPG), un antagoniste de RANKL, qui va donc à l'inverse bloquer la différenciation et l'activité des ostéoclastes, diminuant l'activité de résorption osseuse. Les ostéocytes contrôlent également l'activité de formation osseuse via la sécrétion de la sclérostine (Sost) et de Dkk1 (*c.-à-d Dickkopf WNT Signaling Pathway Inhibitor 1*). Ces derniers sont tous les deux des inhibiteurs de la voie Wnt/ β -caténine des ostéoblastes, nécessaire à leurs différenciations (Tanaka, Yamaguchi, et Hakeda 1995; Zhao et al. 2002; Heino, Hentunen, et Väänänen 2004). La sclérostine ostéocytaire est également capable d'inhiber directement l'activité ostéoblastique par antagonisation des récepteurs BMPs ostéoblastiques et par régulation des voies PHEX/MEPE impliqués dans la minéralisation.

3.2 Les ostéocytes sont des mécanosenseurs

Le modèle du mécanostat (*c.-à-d Théorie de Frost*) du tissu osseux implique la présence de mécanosenseurs. Or, en étant situés au sein de toute la matrice osseuse, mais également via leur organisation structurée sous forme de réseau, les ostéocytes sont les candidats idéaux pour ressentir les déformations tissulaires induites par une contrainte mécanique. De plus, ils sécrètent les différentes

protéines nécessaires au remodelage osseux. L'étude de Skerry et *al.* en 1989 a tout d'abord démontré *in vivo* que l'application d'une charge mécanique cyclique sur l'ulna d'oiseaux provoquait une augmentation après seulement quelques minutes de l'activité de la glucose-6-phosphate déshydrogénase chez les ostéocytes, un marqueur du métabolisme cellulaire, et ceci de manière proportionnelle au taux de contrainte mécanique. Des études *in vitro* ont également démontré que l'application d'une contrainte mécanique sous forme d'un stress fluide sur les ostéocytes induisait une libération immédiate d'oxyde nitrique (NO), ATP, calcium intracellulaire et de prostaglandines (Bakker et al. 2001; Kamioka et al. 1995; Genetos et al. 2005; Zaman et al. 1999; Ajubi et al. 1996). Or, le NO est une molécule qui inhibe la résorption et promeut la formation *in vitro* (Bakker et al. 2001) ; et les prostaglandines induisent *in vivo* la formation osseuse (Forwood 1996). Les libérations d'ATP et de calcium laissent penser à l'existence d'hémi-canaux mécano-sensibles chez les ostéocytes. Des études ont également démontré *in vitro* que les jonctions gap des dendrites ostéocytaires s'ouvraient sous l'effet d'un stress mécanique (Alford, Jacobs, et Donahue 2003; Batra et al. 2012). *In vitro*, le stress mécanique provoque également une elongation et une augmentation des dendrites via l'augmentation de l'expression de la protéine E11/gp38 (K. Zhang et al. 2006). Des études *in vivo* ont démontré qu'une stimulation mécanique réduisait l'expression de Sost, augmentant la formation osseuse (Robling et al. 2008; Tu et al. 2012). A l'inverse, une décharge mécanique provoque une surexpression de Sost inhibant l'ostéoblastogénèse et activant l'ostéoclastogénèse (Kawao et al., 2014). L'application d'un stress mécanique augmente également l'expression de DMP1, qui joue un rôle dans la minéralisation osseuse (Gluhak-Heinrich et al. 2003; Yang et al. 2005).

Les ostéocytes sont donc capables de ressentir la contrainte mécanique mais également de la traduire en signaux biochimiques afin d'adapter le remodelage osseux en conséquence.

3.3 Mécanismes de la mécanosensibilité ostéocytaire

Bien que les ostéocytes soient désormais largement considérés au sein de la communauté scientifique comme les mécanosenseurs du tissu osseux, la manière par laquelle ils ressentent cette contrainte mécanique n'a toujours pas été complètement établie. A ce jour, la principale hypothèse repose sur le fait que l'application d'une charge mécanique globale modifierait la pression extravasculaire et donc le flux du liquide interstitiel osseux, dont les modulations seraient directement ressenties par les ostéocytes (Cowin, Moss-Salentijn, et Moss 1991; Weinbaum, Cowin, et Zeng 1994). D'autres études proposent que le flux du liquide interstitiel ne dépende pas de la pression vasculaire mais de la contraction musculaire (Knothe, Niederer, et Knothe 1998; Li et al. 2010).

A l'image d'une éponge imbibée d'eau, un geste de compression augmente la pression fluide et dirige le flux vers les zones à plus basse pression (*c.-à-d* transport convectif). L'étude Cowin et *al.*

(1991) a démontré qu'une charge compressive axiale au niveau d'un ostéon induisait en effet un flux radial. Le transport de solutés par diffusion au sein du système lacuno-canaliculaire a été mis en évidence *ex vivo* (Wang et al. 2005). Ce flux de liquide interstitiel impose un stress de cisaillement qui déforme les ostéocytes (Weinbaum, Cowin, et Zeng 1994). Cependant, on ne sait toujours pas quels sont les éléments mécanosenseurs, sensibles à ce flux, au sein de l'ostéocyte.

Weinbaum et ses collègues ont proposé un modèle dans lequel des éléments d'ancrages reliant les parois des canalicules et les dendrites ostéocytaires, seraient déformées sous la contrainte fluide. Cependant, il a depuis été mis en évidence par imagerie en temps réel que les dendrites ostéocytaires n'étaient pas statiques, mais au contraire présentaient des mouvements d'extensions et de rétractations, ces points d'ancrage au niveau des dendrites ne seraient alors que transitoires (Y. Han et al. 2004; Veno et al. 2006). D'autres études ont proposé une mécanosensibilité via les intégrines (Salter, Robb, et Wright 1997), le cil (Temiya et al. 2010), ou par la déformation de la cellule elle-même (Pavalko et al. 2003; Daniel P. Nicoletta et al. 2006; D.P. Nicoletta et al. 2008). Dodd et al. (1999) proposent quant à eux une mécanosensibilité par l'hypoxie des ostéocytes en absence de contrainte mécanique et donc, de transport des différents nutriments via le flux du liquide interstitiel (Dodd, Raleigh, et Gross 1999). Finalement, la mécanosensibilité ostéocytaire résulte probablement de l'ensemble de ces éléments (Fig.6).

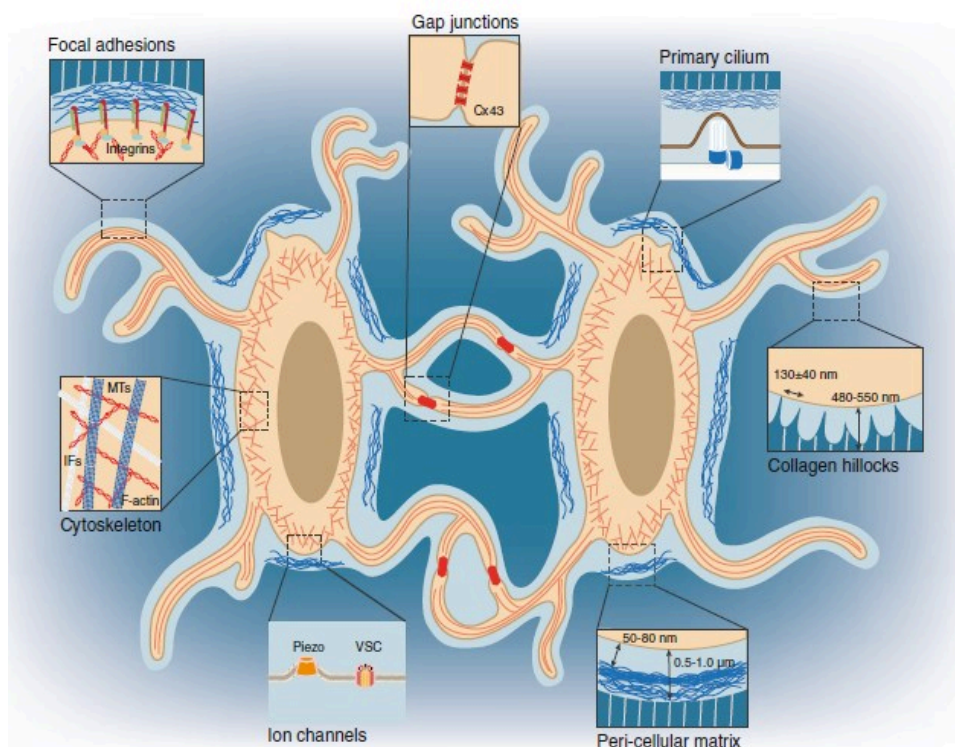


Figure 6 : Illustration de deux ostéocytes adjacents dans le système lacuno-canaliculaire et des principaux éléments pouvant être impliqués dans la mécanosensibilité. D'après Qin et al. (2020).

La nature du stress fluïdique, sa magnitude, ainsi que la fréquence nécessaire pour induire une réponse ostéocytaire, sont toujours méconnues. Cependant, il a été démontré que le taux de contrainte au niveau des lacunes ostéocytaires excédait celui de la contrainte globale appliquée. Ce fait laisse penser à l'existence d'un système d'amplification du signal mécanique, probablement via les propriétés élastiques des membranes du corps cellulaire, du glycocalyx ou des dendrites (You et al. 2001). Certains modèles ont d'ailleurs mis en évidence une diminution du module d'élasticité (*c.-à-d* module de Young) de la matrice péri-lacunaire sous l'action d'un traitement PTH ou glucocorticoïdes, qui était corrélée à une augmentation au taux de contrainte maximale mesurée (Bonivitch, Bonewald, et Nicoletta 2007).

3.4 Les ostéocytes et le métabolisme minéral

Les ostéocytes sont également des acteurs de la régulation du métabolisme minéral. En effet, ils sécrètent plusieurs protéines spécifiques à celui-ci comme Phex, Dmp1, Mepe et Fgf23. Dmp1 et Phex diminuent l'expression de FGF23, ce qui favorise la réabsorption du phosphate par les reins et maintient un taux circulant suffisant pour maintenir le contenu minéral osseux (BMC). Les ostéocytes expriment également fortement la protéine dentin matrix 1 (Dmp1) qui est indispensable à la minéralisation de la matrice osseuse (Toyosawa et al. 2001; Ling et al. 2005).

En plus de contrôler le remodelage osseux au niveau des surfaces osseuses, les ostéocytes sont également capables d'effectuer un remodelage péri-lacuno-canaliculaire, afin de renouveler, dégrader, ou ajouter des composés organiques et minéraux composant la MEC environnante (Yee et al. 2019; Vahidi et al. 2020). La surface canaliculaire représentant environ 215m² chez le squelette humain, c'est-à-dire une surface qui dépasse de loin la surface osseuse sujette au remodelage par les ostéoclastes et les ostéoblastes, le remodelage péri-lacuno-canaliculaire (PLC) joue un grand rôle dans l'homéostasie osseuse (Buenzli et Sims 2015). Tout d'abord, le remodelage PLC participe au maintien de la qualité du tissu osseux par le renouvellement de la MEC, via la sécrétion de métalloprotéinases telles que MMP14 (Tang et al. 2012; Dole et al. 2017). Les ostéocytes sont également capables de résorber la matrice péri-lacunaire grâce à la sécrétion d'enzymes de résorption telles que TRAP et Cathepsin K. Ce phénomène appelé ostéolyse, permet de libérer des minéraux. Il a tout d'abord été mis en évidence chez des souris femelles allaitantes qui présentaient des lacunes et canalicules ostéocytaires élargies, ainsi qu'une augmentation de l'expression des gènes TRAP et Cathepsin K (Qing et al. 2009, Hemmatian et al. 2018). Le phénomène d'ostéolyse a également été mis en évidence chez des animaux en hibernation (Haller et Zimny 1977). L'ostéolyse ostéocytaire semble donc intervenir lors d'un besoin accru de l'organisme en minéraux. A l'inverse, une diminution de la taille des lacunes ainsi qu'un changement de leur morphologie ont été observés avec le vieillissement (Tiede-Lewis et al. 2017; Heveran et al. 2018). De plus, une hyperminéralisation des lacunes pouvant menant progressivement à une occlusion complète

de celles-ci, ont été mis en évidence chez les sujets âgés. On parle de micropétrose (Milovanovic et al. 2017).

Or, des modifications de la matrice péri-lacunaire pourraient également altérer la magnitude des contraintes mécaniques ressenties par les ostéocytes et modifier leurs réponses (Tsourdi et al. 2018).

Les ostéocytes contrôlent le remodelage osseux et sont les parfaits candidats pour le rôle de mécanosenseurs du tissu osseux. Cependant, la nature de la contrainte mécanique et la manière dont ils la ressentent sont encore des questions sans réponse claire.

4. La perte osseuse chez les astronautes

Dans l'espace, la gravité terrestre est presque nulle, on parle de microgravité. La principale charge mécanique du système squelettique induite par le poids corporel n'est plus présente. En absence de toute forces externes pour induire des contraintes mécaniques au niveau des tissus, le système musculo-squelettique des astronautes s'affaiblit rapidement.

4.1 Evolution du système squelettique lors d'un vol spatial

Détérioration de la masse osseuse site-spécifique

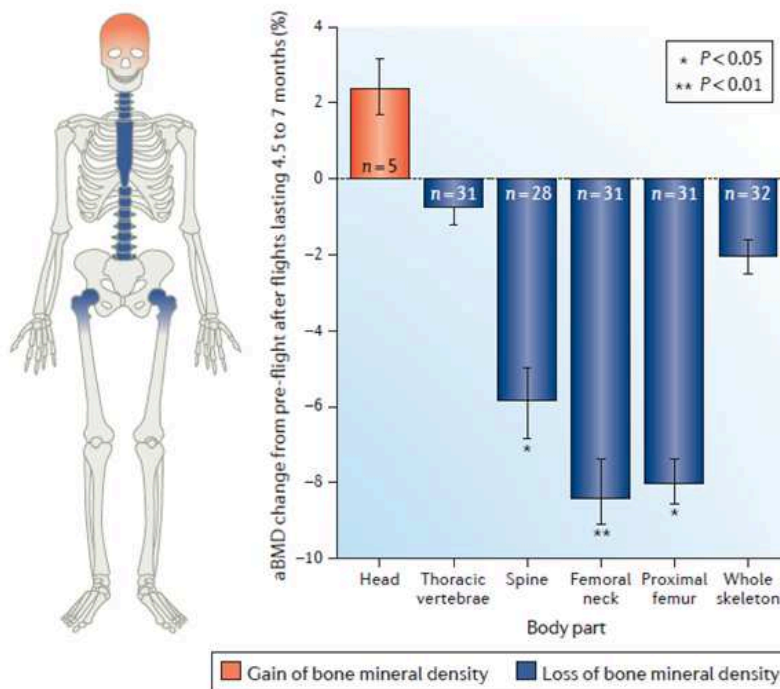


Figure 7 : Variations de la densité minérale osseuse (BMD, *Bone Mineral Density*) chez des cosmonautes après un vol à bord de la station spatiale Mir. D'après Vico et Hargens (2018).

L'exposition prolongée à la microgravité n'a pas les mêmes effets sur l'ensemble du système squelettique. La perte de masse osseuse (*c.-à-d* aBMD) est principalement observée au niveau des membres inférieurs, du bassin et de la colonne vertébrale. La microgravité impacte l'os trabéculaire plus rapidement et en plus grande proportion que l'os cortical. En effet, une diminution de la vBMD trabéculaire du tibia est observée dès le premier mois de vol et continue à se dégrader jusqu'à atteindre une perte de 5.43% après 6 mois de vol (Vico et al. 2000). Dans le cortex tibial, la perte osseuse est

observée à partir de 2 mois de vol et atteint une perte de 1.78% après 6 mois dans l'espace. Les os de la cage thoracique (*p. ex* vertèbre thoracique) et des membres supérieurs (*p. ex* humérus) ne présentent pas de diminution de la BMD quel que soit la durée du vol spatial. A l'inverse, les os du crâne présentent quant à eux une augmentation de l'aBMD (LeBlanc et al. 2000; Vico et al. 2000; 2017). La variation de la BMD osseuse de l'ensemble du squelette demeure cependant négative après un vol spatial (Fig.7).

Détérioration de l'architecture et de la résistance osseuse

L'imagerie haute résolution pQCT (*c.-à-d* *peripheral Quantitative Computed Tomography*) a également permis d'évaluer la géométrie osseuse via les paramètres de l'épaisseur (*c.-à-d* Ct.Th, *Cortical Thickness*) et de l'aire corticale (*c.-à-d* Ct.Ar, *Cortical cross-sectional Area*), chez des cosmonautes, avant et après 4 à 6 mois de vol spatial. L'épaisseur et l'aire corticale présentent respectivement une diminution de 4% et 7% au niveau du tibia. La porosité corticale quant à elle augmente de 15%. Concernant le compartiment trabéculaire, le volume osseux (*c.-à-d* BV/TV, *Bone Volume/Total Volume*) diminue de 2% sans que le nombre et l'épaisseur des trabécules, ainsi que l'espace inter-trabéculaire ne présentent de variations significatives (Vico et al. 2017). Cette dégradation architecturale est accompagnée d'une dégradation des paramètres de résistance osseuse tels que la charge maximale pouvant être endurée par l'os (*c.-à-d* *ultimate load*) et les indices de forces de compression et de flexion du tissu osseux (Vico et al. 2017; Lang et al. 2004).

Déséquilibre de l'activité cellulaire osseuse

L'activité cellulaire osseuse chez les astronautes a été exclusivement analysée par des prélèvements sanguins et urinaires. Les marqueurs de formation tels que l'alkaline phosphatase et les fragments collagéniques P1NP/P1CP présentent soit une diminution, soit aucune variation lors de 20 à 180 jours de vol à bord de la station Mir (Caillot-Augusseau et al. 1998; 2000; Collet et al. 1997). Une augmentation de ces mêmes marqueurs a cependant été observé en fin de vol spatial (*c.-à-d* 180 jours) (Smith, Heer, et al. 2012; Vico et al. 2017).

A l'inverse, les marqueurs de résorption CTX-I et NTX-I présentent une augmentation rapide dès les premiers de vol (8^{ème} jour dans l'étude de Caillot et al., 2000 ; 15^{ème} jour dans l'étude de Smith et al., 2012). Les taux de ces marqueurs continuent d'augmenter jusqu'à 21 jours de vol (Caillot-Augusseau et al. 2000) puis atteignent un plateau qui persiste jusqu'à 6 mois de vol spatial (Vico et al. 2017; Smith, McCoy, et al. 2012).

La sclérostine, un marqueur de l'activité ostéocytaire, a également été analysée dans deux études (Vico et al. 2017; Smith et al. 2015), mais n'a présenté aucune variation significative lors de 6 mois de vol spatial.

Ces analyses sanguines et urinaires semblent donc indiquer que la perte osseuse spatiale est principalement causée par une augmentation nette de l'activité de résorption alors que la possible diminution de l'activité de formation n'est pas clairement établie. Cependant, ces marqueurs systémiques ne prennent pas en compte la variation localisée du stress tissulaire et de l'activité cellulaire.

Détérioration du métabolisme minéral

Bien que les niveaux de calcium sérique ne varient pas hors des taux normaux lors des vols spatiaux (Vico et al. 2017; Smith et al. 2005), les niveaux de calcium urinaires augmentent dès 15 jours dans l'espace (Smith et al. 2005; Smith, McCoy, et al. 2012). Cette perte de calcium avait déjà été observée lors de la mission Apollo 17, où il a été estimé chez les astronautes une perte de 0.2% du calcium corporel total et de 0.7% du phosphate corporel total (Rambaut, Leach, et Johnson 1975). Cette hypercalciurie, et être associée à une diminution du niveau de PTH et de vitamine D (Smith et al. 1998; 1999; Caillot-Augusseau et al. 1998) pour maintenir la calcémie dans des valeurs normales.

Autres variations pouvant influencer le système squelettique

En condition de microgravité, les mouvements corporels ne rencontrent pratiquement aucune résistance. A l'image du système squelettique, on observe chez les astronautes une diminution de la masse et de la fonction musculaire (*c.-à-d* force et endurance), plus particulièrement dans les muscles posturaux qui sont en permanence sollicités sur Terre (Gopalakrishnan et al. 2010). Ce déconditionnement musculaire pourrait également participer à celui du système squelettique par diminution de la contrainte mécanique exercée sur l'os.

La transition de la gravité terrestre à la microgravité élimine les gradients hydrostatiques du système vasculaire résultant en une redistribution des fluides vers le haut du corps (Hargens et Richardson 2009). L'augmentation du volume sanguin au niveau de la tête pourrait expliquer l'augmentation de la masse osseuse du crâne. A l'inverse, la diminution du volume et de la pression sanguine dans les membres inférieurs pourraient également participer à la diminution de la contrainte mécanique exercée sur l'os (B. Zhang et al. 2013).

Le cartilage et les disques intervertébraux participent au ressenti mécanique du système squelettique. Or, ils sont adaptés à une force de compression cyclique via la marche sur Terre. Dans l'espace, la colonne vertébrale diminue sa courbure et les disques intervertébraux deviennent plus rigides, ce qui pourrait moduler le ressenti mécanique du tissu osseux (Vico et Hargens 2018).

L'exposition prolongée à la microgravité semble donc provoquer une détérioration osseuse spécifique au niveau des os porteurs tels que les vertèbres lombaires, le pelvis et le fémur, alors que les

os non porteurs tels que l'humérus ou les vertèbres thoraciques sont épargnés. Cette diminution osseuse, accompagnée d'une dégradation de l'architecture et de la résistance, est provoquée par un déséquilibre du remodelage osseux en faveur de l'activité de résorption.

4.2 Evolution du système squelettique après retour sur Terre

Récupération incomplète dans les os porteurs

Les études de Vico et al. (2000, 2017), Collet et al. (1997) et Lang et al. (2006) ont étudié l'évolution du système squelettique des astronautes ayant effectué 4 à 6 mois de vol spatial après 6 à 12 mois après leur retour sur Terre. Même après un an sur Terre, la masse osseuse du tibia ou du fémur, n'est toujours pas retournée aux valeurs pre-vol chez les astronautes. On observe une évolution différente du compartiment cortical et trabéculaire après retour sur Terre. La vBMD corticale du fémur et/ou du tibia récupère sa valeur initiale après 6 mois via une augmentation de l'épaisseur corticale. Cependant après un an sur Terre, sa porosité reste toujours plus élevée que celle avant le vol spatial. La vBMD trabéculaire ainsi que le BV/TV trabéculaire ne retournent pas quant à eux aux valeurs initiales au bout de 12 mois sur Terre. L'étude de Lang et al. (2006) a mis en évidence une récupération complète de la BMC mais pas de la vBMD, associée à une augmentation de la Ct.Th, suggérant une apposition osseuse périostée compensatrice de la perte osseuse. La résistance osseuse ne récupère pas non plus après un an de récupération.

Le temps de récupération de la masse et de l'architecture osseuse est donc plus long que la durée même du vol spatial. Une modélisation mathématique à partir de données de 45 astronautes estime une perte moyenne de BMD de 6 à 8% au niveau du fémur après un vol spatial de 4 à 6 mois et une récupération de seulement 50% après 7 mois sur Terre.

Dégradation des os non porteurs

Etonnamment, alors que les os des membres supérieurs comme le radius et l'humérus, des os non porteurs, ne présentent aucune variation de leur masse osseuse lors des vols spatiaux, une détérioration progressive de ces os apparaît une fois de retour sur Terre. En effet, la vBMD du radius qui était équivalente à la valeur pre-vol lors du retour sur Terre, présente une diminution significative 6 et 12 mois plus tard (Fig.8). Cette dégradation de la masse osseuse s'explique par une diminution de la vBMD trabéculaire alors que la vBMD corticale ne présente pas de variation. Cependant, l'épaisseur corticale se dégrade elle aussi dès 3 mois après le retour sur Terre. Bien que non significative, la

résistance du radius présente également une tendance à la diminution. Malheureusement, l'ensemble de ces paramètres continuent de se dégrader jusqu'à un an après retour sur Terre (Vico et al. 2017).

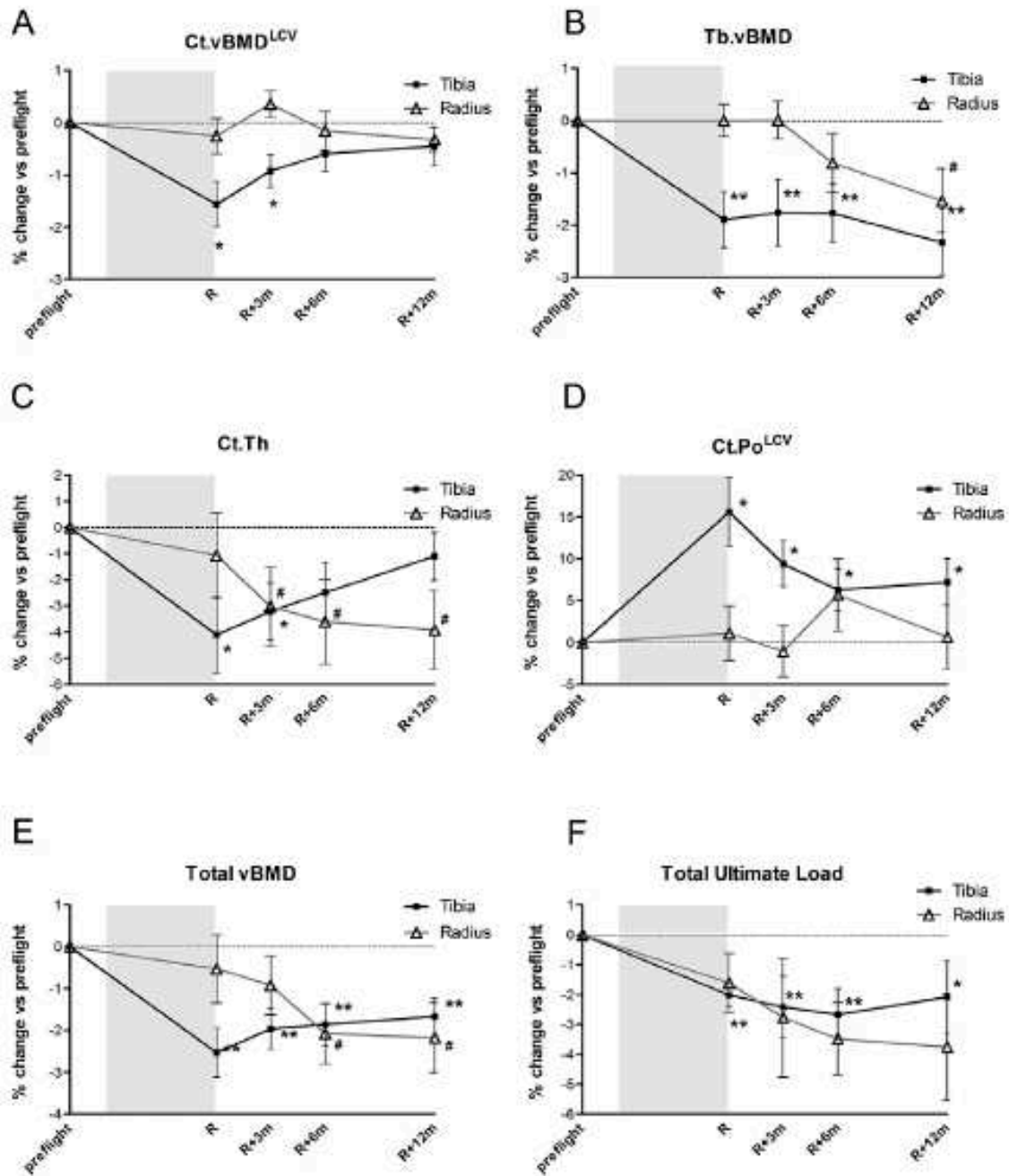


Figure 8 : Données HR-pQCT (radius et tibia) au retour sur Terre (R) et durant un suivi de 1 an (R+3,6,12 mois). Les données représentées correspondent aux différences en pourcentage comparées aux valeurs pre-vol. D'après Vico et al., (2017). HR-pQCT = high-resolution peripheral quantitative computed tomography; vBMD = volumetric bone mineral density; A, Ct.vBMD_{LCV} = cortical volumetric bone mineral density; B, Tb.vBMD = trabecular volumetric bone mineral density; C, Ct.Th = cortical thickness; D, Ct.Po_{LCV} = cortical porosity; E, Total vBMD; F, Total Ultimate Load, LCV=Largest Common Volume of the individual multiple measurements during the follow-up.

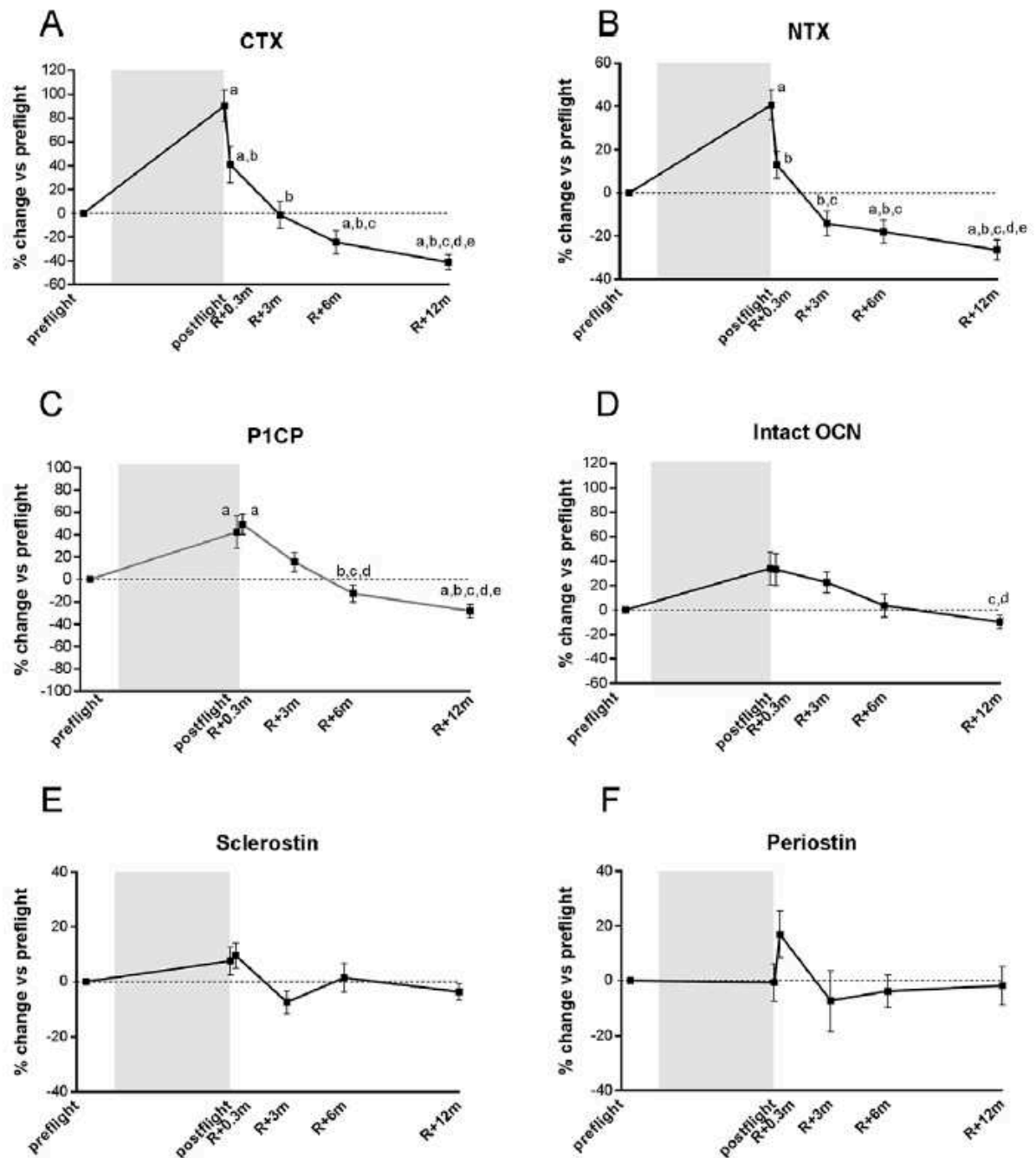


Figure 9 : Variations de marqueurs biochimiques sériques au retour sur Terre (R) et durant 1 suivi de 1 an (R+3,6,12 mois). Les données représentées correspondent aux différences en pourcentage comparées aux valeurs pre-vol. D'après Vico et al., (2017). CTX = C-terminal cross-linked telopeptide of type I collagen; NTX = N-terminal cross-linked telopeptide of type I collagen; P1CP = C-terminal propeptide of type 1 procollagen; Intact OCN = intact/N-mid fragment osteocalcin.

Dégradation du remodelage osseux

Les marqueurs cellulaires du remodelage osseux ont également été observés après une période de récupération afin d'expliquer l'évolution du système squelettique durant cette période. Les marqueurs de formation qui avaient présenté une augmentation en fin de vol spatial (*c.-à-d* 180 jours) redescendent aux taux pre-vol dans les 3 mois après retour sur Terre. Les marqueurs de résorption diminuent dès les premiers jours sur Terre et atteignent leurs valeurs initiales dans les 3 mois suivants. Cependant, les taux des marqueurs de formation et de résorption déclinent progressivement entre les 6 et 12 mois suivant le retour sur Terre, indiquant une diminution de l'activité de formation et de résorption osseuse (Fig.9) (Vico et al., 2017).

L'activité réduite du remodelage osseux, ainsi que l'absence de récupération de la masse et de l'architecture osseuse malgré un retour à la gravité terrestre, laisse penser que les ostéocytes ne sont plus capables de ressentir la contrainte mécanique, ou de la traduire en signaux biochimiques aux ostéoclastes et ostéoblastes. A ce jour, seule une étude spatiale analyse une période de récupération supérieure à un an chez 8 astronautes (Orwoll et al. 2013). Après 2 à 4 ans sur Terre, la majorité des individus présentent une récupération et une stabilisation de l'aBMD au niveau du col du fémur et des vertèbres lombaires L1-L2. Cependant, la vBMD trabéculaire au niveau de ces deux sites continue de se dégrader jusqu'à 4 ans après le retour sur Terre.

Certaines détériorations osseuses sont 4 fois plus importantes que celles observées en 2 ans chez des femmes ménopausées et ostéoporotiques (Burghardt et al. 2010). Si ce déconditionnement osseux persiste, il pourrait promouvoir une ostéopénie précoce ainsi qu'une augmentation des risques fracturaires.

4.3 Contre-mesures

Plusieurs types de contre-mesures ont été testées afin de contre-carrer le déconditionnement osseux et musculaire des astronautes. La principale mesure est la mise en place d'un entraînement physique quotidien lors des vols spatiaux, comprenant des exercices aérobiques et de résistance sollicitant l'ensemble du système musculaire. Des tapis de course, cycloergomètres, et appareils de traction, sont utilisés couplés à des harnais élastiques ou des pompes sous vide afin d'induire davantage de résistance aux mouvements du corps (Fig.10). On parle d'*advanced resistive exercise device* (aRED) pour l'ISS. Cependant, l'aRED ne permet pas d'éliminer totalement la perte osseuse mais la mitige lorsqu'il est associé à un apport nutritionnel contrôlé et un supplément en vitamine D (Smith, McCoy,

et al. 2012). Les programmes d'entraînements effectués en préparation du vol ou lors du retour sur Terre, ont eux aussi, des effets partiels (Petersen et al. 2017).

La seule contre-mesure pharmacologique publiée examine le potentiel du bisphosphonate alendronate afin d'atténuer la résorption et la perte osseuse lors des vols spatiaux (LeBlanc et al. 2013). Chez ces astronautes, le traitement alendronate couplé à une activité physique aRED a permis d'empêcher une augmentation de la résorption osseuse ainsi que de l'hypercalciurie. En comparaison avec des astronautes utilisant l'aRED seul, l'alendronate a prévenu la perte osseuse (aBMD) au niveau de plusieurs sites osseux (c.-à-d. colonne vertébrale, hanche, pelvis). Cependant, il n'existe pas de données concernant la microarchitecture osseuse ni l'évolution des paramètres osseux des astronautes traités à l'alendronate une fois revenus sur Terre.

Considérant les altérations physiologiques qui ont lieu lors des vols spatiaux, notamment la redistribution des fluides vers la tête et les modifications cardio-vasculaires, l'efficacité et l'innocuité des traitements pharmacologiques restent une problématique. En effet, la pharmacocinétique et pharmacodynamique des médicaments utilisés par les astronautes peuvent agir différemment sur Terre et dans l'espace. De plus, l'excès de radiation peut également rendre les médicaments instables. D'autres études sont donc nécessaires (Vico et Hargens 2018).

L'absence de contre-mesures efficaces à ce jour rend d'autant plus importante la compréhension du déconditionnement osseux chez les astronautes alors que les institutions spatiales prévoient des voyages de très longues durées. Bien que l'espace soit un environnement unique et extrême, le déconditionnement osseux qu'il provoque présente de grandes similitudes avec le déconditionnement osseux sur Terre lors du vieillissement ou de l'immobilisation. Les astronautes sont donc également de très bons modèles d'études afin d'améliorer la compréhension du déconditionnement osseux sur Terre.



Figure 10 : Appareils d'exercice à bord de l'ISS. D'après Diaz, Heldt & Young (2015).

5. Le modèle murin de suspension anti-orthostatique

L'étude de la perte osseuse chez les astronautes est restreinte par plusieurs facteurs : peu de sujets, peu d'opportunités et peu d'analyses possibles sans prélever d'échantillons osseux. Afin de pouvoir approfondir l'étude de la perte osseuse spatiale, l'Ames Research Center (NASA) a développé au milieu des années 70 un modèle murin de suspension anti-orthostatique nommé *Hindlimb Unloading* (HLU). Ce modèle repose sur la suppression des contraintes mécaniques induites par les forces de réaction exercées par le sol, sur les membres inférieurs, induisant une perte musculaire et osseuse rapide.



Figure 11 : Souris suspendue vue de profil. Photographie personnelle.

Dans ce modèle, la souris est suspendue par la queue de manière à surélever les pattes arrière (Fig.11). Un angle de 30° entre l'abdomen et le sol permet de respecter la répartition naturelle des charges chez la souris, c'est-à-dire de manière égale entre les membres antérieurs et postérieurs. La souris ne pouvant poser ses pattes arrières sur le sol, la contrainte mécanique induite par la charge du poids corporel disparaît et induit ainsi une perte osseuse rapide au niveau des membres postérieurs et des vertèbres (Aguirre et al. 2006; Plotkin et al. 2015). Contrairement à d'autres modèles d'immobilisation, l'HLU induit par la position de l'animal un shift des fluides vers les régions céphaliques, ainsi qu'une atrophie musculaire des membres postérieurs, comme observé chez les astronautes. Le modèle HLU met en décharge les membres postérieurs sans restreindre les mouvements. Ce modèle offre également la possibilité d'étudier la réponse à la récupération puisque la suspension de la souris est réversible, un point important afin d'approfondir les effets à long terme des vols spatiaux.

5.1 Effet de l'HLU sur les paramètres architecturaux osseux

L'HLU est pratiquée sur des rats ou des souris, pour une durée de 1 à 28 jours (Aguirre et al. 2006). Ce sont principalement les os longs des membres postérieurs, le fémur et le tibia, qui sont analysés dans le contexte de perte osseuse, mais les vertèbres lombaires sont également parfois évaluées.

Dégradation des paramètres trabéculaires

L'HLU induit principalement une perte osseuse trabéculaire (BV/TV) dès 7 jours (Sakata et al. 1999) et jusqu'à 28 jours (Metzger et al. 2017; Saxena et al. 2011; Shahnazari et al. 2012). La diminution du BV/TV trabéculaire est majoritairement associée à une diminution de l'épaisseur des trabécules (Tb.Th, *Trabecular Thickness*) et une augmentation de l'espace inter-trabéculaire (Tb.Sp, *Trabecular Spacing*). Le nombre de trabécules (Tb.N, *Trabecular Number*) est diminué dans la majorité des études (Basso et al. 2005; Cabahug-Zuckerman et al. 2016; Lin et al. 2009; Plotkin et al. 2015; Sakata et al. 1999; Saxena et al. 2011; Shahnazari et al. 2012) mais peut également ne présenter aucune variation pour un temps de suspension identique (Moriishi et al. 2012). La connectivité des trabécules (Conn.D, *Connectivity Density*) présente également une diminution avec l'HLU lorsqu'elle est mesurée (Lin et al. 2009).

Dégradation des paramètres corticaux

Bien que moins documentée, l'HLU induit également une perte osseuse au niveau du cortex, via la diminution de l'aire et/ou de l'épaisseur corticale. Cette perte osseuse corticale a été mise en évidence dès 7 jours de suspension au niveau des vertèbres lombaires (Aguirre et al. 2006) et après 14 jours de suspension au niveau du tibia et/ou du fémur (Basso et Heersche 2006; Metzger et al. 2017; Peres-Ueno et al. 2017; Plotkin et al. 2015; Simske et al. 1992). Cependant, les paramètres corticaux du fémur et/ou du tibia n'ont pas été analysés sur des temps de suspension inférieurs à 14 jours. L'aire médullaire a été peu analysée, mais présente une augmentation avec la suspension, suggérant une résorption osseuse endocorticale (Aguirre et al. 2006; Peres-Ueno et al. 2017). La perte osseuse d'immobilisation corticale a lieu dans des moindres proportions que la perte osseuse trabéculaire.

Altération de la minéralisation et de la résistance osseuse

Une réduction de la BMD ou du BMC a été observée au niveau du tibia et du fémur, que ce soit dans le compartiment trabéculaire ou cortical (Lin et al. 2009; Metzger et al. 2017; Peres-Ueno et al. 2017; Shahnazari et al. 2012; Macias et al. 2012). Deux études ont également rapporté une augmentation

de la porosité corticale et une dégradation des paramètres de résistance et de rigidité de l'os (Peres-Ueno et al. 2017; Plotkin et al. 2015).

5.2 Effet de l'HLU sur l'activité cellulaire osseuse

L'HLU est systématiquement accompagnée d'une augmentation significative de la résorption ostéoclastique au niveau des trabécules et du cortex (Cabahug-Zuckerman et al. 2016; Metzger et al. 2017; Sakata et al. 1999; Saxena et al. 2011; Shahnazari et al. 2012). L'activité de formation osseuse dans le modèle HLU est quant à elle plus discordante. En effet, certaines études rapportent une diminution de la formation osseuse (Basso et al. 2005; Lin et al. 2009; Metzger et al. 2017; Peres-Ueno et al. 2017; Sakata et al. 1999; Sessions et al. 1989; Simske et al. 1994; Macias et al. 2012) et d'autres, aucune variation de l'activité (Shahnazari et al. 2012; Saxena et al. 2011; Spatz et al. 2013; Halloran et al. 1988; Moriishi et al. 2012). La perte osseuse induite par HLU semble donc davantage résulter d'une augmentation de la résorption que d'une diminution de la formation.

5.3 Comparaison avec la perte osseuse spatiale murine

Seules quelques études spatiales ont étudié l'évolution du système squelettique chez la souris (B. Zhang et al. 2013; Tavella et al. 2012; Lloyd et al. 2015; Blaber et al. 2013; Berg-Johansen et al. 2016; Gerbaix et al. 2017). L'investigation du fémur ou du tibia après les vols spatiaux présentent une diminution de la masse osseuse par une dégradation des différents paramètres trabéculaires et corticaux. Une diminution de l'épaisseur corticale a été mise en évidence dans plusieurs études (Gerbaix et al. 2017; Blaber et al. 2013; Tavella et al. 2012) mais seule l'étude de Gerbaix et al. rapporte également une diminution de l'aire corticale sans variation de l'aire médullaire, suggérant une résorption périostée. Les ostéoclastes sont d'ailleurs proéminents au niveau du périoste. Cette dégradation osseuse est associée à une augmentation drastique de la résorption et une légère diminution de la formation osseuse (Gerbaix et al. 2017; Lloyd et al. 2015).

Le modèle HLU induit donc une perte osseuse d'immobilisation au niveau des os porteurs tels que le fémur, le tibia ou les lombaires. La dégradation de la masse et de l'architecture osseuse a principalement lieu dans le compartiment trabéculaire, et semble davantage résulter d'une augmentation de l'activité de résorption que d'une diminution de l'activité de formation. L'évolution du système squelettique chez le modèle murin suspendu est donc similaire à celle des astronautes.

6. Rôles des ostéocytes dans la perte osseuse d'immobilisation

Puisque les ostéocytes sont considérés comme les mécanosenseurs et orchestrateurs du remodelage osseux par la régulation des activités ostéoblastiques et ostéoclastiques (Bonewald 2011), de nombreuses études HLU ont étudié leur rôle dans la perte osseuse d'immobilisation.

6.1 Messagers chimiques ostéocytaires dans la perte osseuse d'immobilisation

Cette perte osseuse induite par la suspension semble être provoquée par l'augmentation de l'expression ostéocytaire de RANKL, activant les ostéoclastes et promouvant la résorption (Xiong et al. 2015). Cette augmentation a été observée dès 5 jours d'HLU (Cabahug-Zuckerman et al. 2016). Une diminution de l'expression d'OPG ostéocytaire a également été observée en parallèle de l'augmentation de l'expression de RANKL dans l'étude de Plotkin et al., 2015. Plusieurs études ont également rapporté l'augmentation de l'expression ostéocytaire de la sclérostine (Metzger et al. 2017; Spatz et al. 2013). Cependant dans l'étude de 2012 de Moriishi et al., aucune variation de l'expression ostéocytaire de RANKL, OPG et de la sclérostine n'a été observée après une période de suspension de 3 jours. Moriishi et al. suggèrent une résorption menée par une augmentation de la production de RANKL ostéoblastique, une production pourtant très inférieure à celle des ostéocytes (Bellido 2014). Bien que les études HLU aient mis en évidence des variations des molécules ostéocytaires lors de la perte osseuse, les résultats sont trop discordants pour tirer des conclusions sur la signalisation ostéocytaire aboutissant à la perte osseuse.

6.2 La mort ostéocytaire dans la perte osseuse d'immobilisation

La présence de lacunes ostéocytaires vides a tout d'abord été mise en évidence dans du tissu osseux humain âgé, ostéoporotique ou arthrosique, associée à une fragilité osseuse accrue (Frost 1960; Dunstan et al. 1990), suggérant une mort des ostéocytes. Il a alors été proposé que cette fragilité puisse résulter de la perte de la capacité ostéocytaire à ressentir les microfractures et de signaler aux autres cellules de réparer le tissu. En 1997, Noble et al. ont mis en évidence dans du tissu osseux humain pathologique ou âgé, ainsi qu'au niveau de la calvaria de nouveau-nés, la présence d'apoptose au niveau des ostéocytes qui n'a pas été retrouvé chez les adultes sains, suggérant un lien entre l'apoptose des ostéocytes et le processus de remodelage osseux (Noble et al. 1997). L'apoptose est une mort cellulaire programmée qui intervient de manière physiologique lors du développement mais également lors du renouvellement normal des tissus.

L'apoptose ostéocytaire (AO) a été mise en évidence dans différents cas : lors d'induction de microfractures (Kennedy et al. 2012; 2014; Cardoso et al. 2009), lors d'une perte osseuse induite par déplétion d'estrogène (Emerton et al. 2010) ainsi que dans le cas d'une perte osseuse induite par un excès de glucocorticoïdes (Piemontese et al. 2016; O'Brien et al. 2004). Les études de Kennedy et Cardoso ont mis en évidence que ce sont les ostéocytes voisins des ostéocytes apoptotiques se trouvant au niveau des microfractures, qui sécrètent les molécules RANKL, OPG et VEGF, responsables de la résorption et de la perte osseuse.

L'utilisation d'inhibiteurs anti-apoptotiques comme l'inhibiteur pan-caspase QVD-OPh a permis de prévenir la sécrétion des molécules ostéocytaires, l'augmentation de la résorption ainsi que la perte osseuse induites par microfractures ou une déplétion d'estrogène. L'utilisation de souris transgénique pour l'enzyme 11 β -HSD2 a également permis de prévenir l'apoptose des ostéocytes et la perte osseuse dans ce modèle. Ces différentes études ont donc démontré que l'AO était requise pour induire une augmentation de la résorption et une perte osseuse.

L'apoptose d'ostéocytaire dans la perte osseuse d'immobilisation

Des évidences d'AO ont été rapportées dans la majorité des études HLU (Aguirre et al. 2006; Basso et Heersche 2006; Cabahug-Zuckerman et al. 2016; Metzger et al. 2017; Plotkin et al. 2015; Swift et al. 2014), ainsi que dans une étude spatiale (Gerbaix et al. 2017). Elle a été observée dès 3 jours de suspension dans les vertèbres lombaires (Aguirre et al. 2006) et dès 5 jours dans le fémur (Cabahug-Zuckerman et al. 2016). Cependant, seule l'étude de Cabahug-Zuckerman et al. démontre que l'AO est requise pour induire une augmentation de la résorption et la perte osseuse. Dans cette étude, une suspension de 5 et 14 jours induit une augmentation de l'AO dans l'os trabéculaire et cortical du fémur. Cette AO est accompagnée d'une augmentation de la sécrétion ostéocytaire de RANKL ainsi qu'une augmentation de la résorption. L'utilisation de l'inhibiteur pan-caspase QVD-OPh a permis de bloquer l'augmentation de l'AO, de la sécrétion de RANKL, ainsi que de la résorption, prévenant la perte osseuse induite par la suspension. Or, l'étude de Plotkin et al., qui observe également une augmentation de l'AO et de RANKL ostéocytaire au niveau des vertèbres, démontre que l'utilisation de l'inhibiteur apoptotique IG9402 (*c.-à-d* bisphosphonate analogue qui préserve la viabilité des ostéoblastes et ostéocytes et n'induit pas d'apoptose ostéoclastique *in vitro*), prévient la survenue de celles-ci, mais pas de la résorption et de la perte osseuse subséquente. Plotkin a alors suggéré que la résorption soit déclenchée par la sécrétion de RANKL par les ostéoblastes. Cependant, le taux de RANKL produit par les ostéoblastes est très faible par rapport au taux ostéocytaire (Xiong et al. 2015).

Bien que toutes les études HLU aient rapporté l'existence d'une mort ostéocytaire, les taux de celle-ci présentent une grande variabilité même chez les groupes contrôles. En effet, on relève parmi l'ensemble des études HLU résumées dans le Tableau 1, un taux d'AO de 0.5 à 15% chez les contrôles,

et de 1 à 38% chez les suspendus. Certaines études trouvent davantage d'AO dans le compartiment trabéculaire (Cabahug-Zuckerman et al. 2016), d'autres davantage dans le compartiment cortical (Basso et Heersche 2006), et encore d'autres de manière équivalente dans les deux compartiments (Aguirre et al. 2006). Lorsque la répartition spatiale de l'AO a été étudiée, elle semble être plus importante, voire seulement présente, dans la zone postérieure de l'os (Cabahug-Zuckerman et al. 2016; Gerbaix et al. 2017). Concernant les missions spatiales, l'étude de Gerbaix et al. a mis en évidence une augmentation de la proportion de lacunes vides, alors qu'à l'inverse, l'étude de Blabler et al. ne met pas en évidence de différence dans la proportion de lacunes vides au niveau du fémur. Cependant, la durée du vol est d'un mois pour l'étude de Gerbaix et al. contre seulement 14 jours pour l'étude de Blabler et al..

Des évidences d'AO ont donc été rapportées dans toutes les études HLU qui l'ont analysée, ainsi que dans l'étude spatiale de Gerbaix et al. Seule l'étude spatiale de Blabler et al. ne rapporte aucun signe d'AO. Cependant, la littérature reste contradictoire sur la nécessité de cette AO pour provoquer la perte osseuse d'immobilisation. De plus, les taux d'AO observés sont très variables concernant leurs proportions et leurs localisations. Le rôle et la cinétique des molécules ostéocytaires RANKL, SOST et OPG n'est pas non plus clairement établi.

Considérations méthodologiques dans l'analyse de la mort ostéocytaire

En fonction des études HLU, la mort ostéocytaire est évaluée avec les méthodes suivantes :

- En comptant le nombre de lacunes ostéocytaires pleines/vides sur une coupe histologique.
- En comptant le nombre d'ostéocytes apoptotiques via un marquage TUNEL (*c.-à-d. deoxynucleotidyl Transferase dUTP Nick End Labelling*) sur une coupe histologique.
- En comptant le nombre d'ostéocytes apoptotiques via un immunomarquage caspase 3 activé sur une coupe histologique.

Le comptage de lacunes ostéocytaires vides est une des méthodes les plus utilisées pour estimer le nombre d'ostéocytes morts. Cependant, cette analyse repose sur la croyance qu'un ostéocyte mort laisse derrière lui un espace vide sans aucun débris cellulaire, un phénomène qui n'a jamais été démontré. De plus, le temps qui s'écoule entre la mort d'un ostéocyte et le vide total d'une lacune est inconnu (Marotti et al. 1998). La présence de lacunes vides sur une coupe histologique pourrait également résulter d'artefacts de préparation de l'échantillon. En effet, sur une coupe histologique d'épaisseur de 5 à 8 μm ; une épaisseur souvent utilisée (Tableau 1); la fixation peut entraîner un phénomène de rétractation tissulaire décrochant les ostéocytes de leur matrice péri-lacunaire et ainsi mener à des faux positifs. Une faible épaisseur de coupe histologique peut également laisser apparaître des lacunes vides alors que le noyau se trouve dans un plan inférieur ou supérieur à la coupe (Jilka, Noble, et Weinstein 2013).

Tableau 1 : Récapitulatif des études HLU et spatiales ayant étudié la mort ostéocytaire chez le rat ou la souris.

Etude	Sujets	Temps de suspension/vol	Technique d'analyse	Paramètre mesuré	Os et zone analysée	Résultats	
Etudes HLU							
Aguirre et al., 2006	Souris Swiss Webster femelles Age non spécifié	1,3,7,18 jours	IHC ISEL sur coupe paraffine 5 µm	% d'ostéocytes apoptotiques	Vertèbre lombaire L1 Compartiment trabéculaire	CONT 0,5-1% (J3 à J18)	HLU 1-1,5% (J3 à J18)
					Vertèbre lombaire L1 Compartiment cortical	CONT 0,5-1% (J3 à J18)	HLU 1-1,5% (J3 à J18)
Basso et Heersche, 2006	Rats Fischer mâles 5 semaines	14 jours	IHC caspase 3 activé sur coupes paraffine 7 µm	% d'ostéocytes apoptotiques	Tibia proximal Compartiment trabéculaire	CONT 2,1%	HLU 3,5%
					Tibia proximal Compartiment cortical	CONT 11,7%	HLU 15,4%
Cabahug-Zuckerman et al., 2016	Souris C57BL/6J mâles 4 mois	5 et 14 jours	IHC caspase 3 activé sur coupes ethyl methacrylate 5 µm	% d'ostéocytes apoptotiques	Fémur distal Compartiment trabéculaire	CONT ~5% (J14)	HLU ~17% (J5) , ~19% (J14)
					Fémur mid-diaphyse Compartiment cortical	CONT ~1% (J5)	HLU ~5% (J5)
Metzger et al., 2017	Rats Sprague Dawley mâles 7 mois	28 jours	IHC sur coupes paraffines 8µm	Densité ostéocytaire/Volume osseux (#)	Fémur distal Compartiment trabéculaire	CONT ~42	HLU ~30
Plotkin et al., 2015	Souris C57BL/6 femelles 4 mois	Non spécifié	IHC TUNEL sur coupes paraffine 5µm	% d'ostéocytes apoptotiques	Vertèbre lombaire L3-L4 Compartiment trabéculaire	CONT 15%	HLU 38%
Swift et al., 2014	Rats Sprague-Dawley mâles 6 mois	28 jours	IHC TUNEL sur coupe paraffine 8 µm	% d'ostéocytes apoptotiques	Fémur distal Compartiment trabéculaire	CONT 4%	HLU 7%
				% lacunes occupées	Fémur distal Compartiment trabéculaire	CONT 95%	HLU 65%
Etudes de vol spatial							
Blaber et al., 2013	Souris C57BL/6J femelles 16 semaines	15 jours	IHC sur coupes paraffine 7 µm	% lacunes vides	Fémur proximal Compartiment cortical	CONT ~10%	Vol ~10%
			RT-qPCR	Expression P21 et P53	Pelvis	Vol : augmentation de l'expression de P21 diminution, de l'expression de P53	
Gerbaix et al., 2017	Souris C57BL6/ N mâles 23 semaines	30 jours	IHC sur coupes paraffine 5 µm	% lacunes vides	Fémur Compartiment cortical	CONT 3,6%	Vol 11,4%

Le comptage de lacunes vides ne permet pas d'identifier le type de mort cellulaire. Le terme d'apoptose ostéocytaire est généralement employé à tort dans les études HLU alors qu'aucun signe spécifique de l'apoptose n'a été démontré. S'il y a mort cellulaire, il pourrait s'agir d'apoptose mais également d'autophagie, de nécroptose ou de sénescence. L'étude de Blabler et *al* a d'ailleurs identifié une augmentation de l'expression de gènes de sénescence mais pas de celle de gènes apoptotiques. Des ostéocytes autophagiques ont également été mis en évidence dans le cas d'une perte osseuse induite par un excès de glucocorticoïdes (Xia et al. 2010).

Les marquages histochimiques TUNEL ou ISEL (*c.-à-d In Situ End-Labeling*) détectent l'ADN fragmenté, spécifique aux phénomènes de nécrose et de l'apoptose. L'immunomarquage de la caspase 3 activée détecte quant à elle, spécifiquement l'apoptose *in situ*. Cependant, il a été démontré que certains protocoles de décalcification et de traitements pré-marquage pouvaient également mener à des faux-positifs (Emans, Bulstra, et Kuijer 2005; Stähelin et al. 1998).

La variété des résultats d'apoptose ostéocytaire et la difficulté de leurs analyses rendent difficile une compréhension du rôle des ostéocytes dans la perte osseuse d'immobilisation et/ou de microgravité. Il est nécessaire d'effectuer des analyses dont les résultats ne soient pas confondus par des artefacts techniques.

Analyse du réseau ostéocytaire et lacuno-canaliculaire

A ce jour, une seule étude HLU a étudié l'évolution de la morphologie du réseau ostéocytaire (D. Zhang et al. 2019). Dans cette étude, une diminution du nombre de dendrites par ostéocyte a été rapportée en parallèle d'une diminution de la densité ostéocytaire. Aucune autre étude n'a analysé la morphologie du réseau ostéocytaire, que ce soit au sein d'un vol spatial ou dans d'autres modèles d'immobilisation (*p.ex* immobilisation par toxine botulique). Cependant, cette absence de donnée est probablement due à la difficulté des analyses, puisque les ostéocytes emmurés dans la matrice osseuse sont difficilement accessibles, compliquant la possibilité d'imagerie. La morphologie du réseau lacuno-canaliculaire a quant à lui été analysé dans quelques études. En effet, en plus d'analyser la présence de lacunes, les études spatiales de Gerbaix et Blaber ont analysé leur morphologie grâce à une imagerie synchrotron ou nano-CT (*c.-à-d nano Computed Tomography*). Malheureusement, les résultats sont contradictoires. Alors que la première étude (Gerbaix et al. 2017) met en évidence une diminution du volume lacunaire au niveau du fémur, la seconde rapporte à l'inverse une augmentation de l'aire lacunaire et du diamètre des canalicules au niveau du pelvis, concordante avec une augmentation de l'expression des gènes *Mmp1*, *3* et *10*, impliqués dans l'ostéolyse ostéocytaire (Blaber et al. 2013). Cependant, aucune étude HLU n'a analysé la morphologie du réseau lacuno-canaliculaire à ce jour.

Une altération dans le réseau ostéocytaire ou lacuno-canaliculaire pourrait pourtant expliquer un dysfonctionnement dans la mécanosensibilité, la mécanotransduction et la viabilité ostéocytaire.

7. Métabolisme, température et perte osseuse

7.1 Le tissu adipeux médullaire et le tissu osseux

Le tissu adipeux (TA) est un tissu conjonctif contenant des cellules qui stockent des triglycérides, les adipocytes. Dans le corps humain, il en existe 3 types. Le tissu adipeux blanc est le plus répandu dans l'organisme, il constitue une réserve énergétique, en libérant les lipides contenus dans ces cellules en période de jeun. Le TA blanc a également un rôle de protection contre le froid, en tant qu'isolant thermique. Il présente un rôle endocrine puisqu'il sécrète de nombreuses hormones (*c.-à-d* adipokines), notamment la leptine qui joue un rôle dans la sensation de satiété, la sensibilité à l'insuline ainsi que sa sécrétion, favorise la lipolyse d'autres dépôts de TA blanc, mais également augmente la résorption osseuse à haute dose, et à l'inverse, prévient la perte osseuse à faible dose. Le TA brun a quant à lui un rôle de thermogénèse. En effet, ces cellules sont particulièrement riches en mitochondries contenant la protéine thermogénine (UCP-1, *uncoupling protein*), qui en cas de besoin, augmentent leur activité d'oxydation de lipides afin de produire de la chaleur pour maintenir la température corporelle à 37-38°C.

Le tissu adipeux médullaire (BMAT, *Bone Marrow Adipose Tissue*) constitue la partie de la moelle osseuse (MO) non hématogène et est principalement constitué d'adipocytes. La BMAT influence la quiescence et la survie des cellules souches hématopoïétiques de la moelle osseuse, et sécrètent comme le TA blanc, des adipokines comme la leptine et l'adiponectine influençant le métabolisme. L'expansion de la BMAT au dépend de la MO hématopoïétique lors du vieillissement est une réponse physiologique normale, mais elle peut également résulter de pathologies telles que l'obésité ou l'ostéoporose (Scheller et al. 2016). En effet, de nombreuses études ont rapporté une corrélation négative entre le volume de BMAT et la BMD du fémur, de la colonne vertébrale ou de la hanche chez des femmes et des hommes d'âge varié (Shen et al. 2012; Gao et al. 2015; Cohen et al. 2012). De plus, les adipocytes matures de la BMAT, sécrètent des facteurs pro-ostéoclastiques RANKL et M-CSF, influençant directement la résorption osseuse (Goto et al. 2011; Lanotte, Metcalf, et Dexter 1982). Afin d'expliquer le lien observé entre BMAT et masse osseuse, un paradigme a été proposé sachant que les adipocytes et les ostéoblastes sont différenciés à partir des mêmes précurseurs, les cellules souches mésenchymateuses osseuses. La favorisation d'une des deux voies de différenciations (*c.-à-d* adipocytaire ou ostéoblastique) se ferait, en général, au dépend de l'autre. Ainsi, une augmentation de la différenciation adipocytaire engendrait une diminution du nombre d'ostéoblastes différenciés, et donc de la formation et de la masse osseuse. Ce paradigme a été mis en évidence dans plusieurs études (Benayahu, Shur, et Ben-Eliyahu 2000; Ahdjoudj et al. 2002; V. David et al. 2007), notamment sous l'effet de la présence ou de l'absence de contrainte mécanique. Cependant, il a été démontré que ce paradigme pouvait être altéré sous certaines conditions, comme par exemple en condition hypoxique ou sous un excès de glucocorticoïde (Wagegg et al. 2012; L. Han et al. 2019).

La contrainte mécanique favorise *in vitro* et *in vivo* la voie ostéoblastique par l'augmentation de l'expression du facteur Runx2 et une diminution de celle de PPAR γ 2, un facteur pro-adipocytaire. Ce profil protéique est associé *in vivo* à une augmentation des paramètres de formation osseuse et une diminution volumique de la BMAT (V. David et al. 2007). A l'inverse, en condition de diminution des contraintes mécaniques, le volume de BMAT semble augmenter. En effet, lors de la mission spatiale Bion M1, les souris présentaient en plus d'une perte osseuse fémorale, une augmentation des adipocytes médullaires (Gerbaix et al. 2017). Des rats ayant effectué un protocole HLU de 7 jours ont également présenté une augmentation du volume de BMAT et du nombre d'adipocytes (Ahdjoudj et al. 2002).

7.2 Température et souris, une question de thermoneutralité

La thermoneutralité est la zone de températures ambiantes entre lesquelles le métabolisme basal génère assez de chaleur pour maintenir une température interne de 37-38°C sans dépense d'énergie supplémentaire. Les humains créent habituellement un environnement thermoneutre en portant des vêtements autour de 20-22°C, correspondant aux conditions standards de logement des souris, alors que leur zone de thermoneutralité est autour de 30°C. De plus, les souris ne sont pas d'aussi bons homéothermes que les humains. Une grande aire de surface et une petite masse corporelle les rendent plus vulnérables aux fluctuations de températures, plus particulièrement lorsqu'elles sont plus basses que leur zone de thermoneutralité. L'exposition à des températures froides active différents mécanismes comportementaux de conservation de chaleur : la vasoconstriction, la piloérection, une posture voûtée (pour minimiser l'aire de surface) et se blottir contre d'autres animaux. Cependant, lorsque ces mécanismes sont insuffisants pour lutter contre le froid, les mammifères augmentent leur métabolisme (*c.-à-d* dépenses énergétiques) afin de générer de la chaleur par des contractions musculaires involontaires (*c.-à-d* *shivering thermogenesis*) et le découplage de la respiration des adipocytes bruns (*c.-à-d* *non-shivering thermogenesis*). Loger les souris à une température de 20-22°C, bien inférieure à leur zone de thermoneutralité, induit un stress thermique important obligeant les souris à produire de manière constante de la chaleur pour maintenir leur température corporelle. Cette production de chaleur est effectuée par l'activation de la thermogénèse du TA brun (Maloney et al. 2014; Karp 2012; Christopher J. Gordon 2017) et implique une augmentation des dépenses énergétiques importantes, affectant de nombreux paramètres physiologiques (Fischer, Cannon, et Nedergaard 2017; Ganeshan et Chawla 2017).

En effet, des souris logées à une température ambiante (T_a) de 20-22°C dépensent 2 fois plus d'énergie et double leur consommation alimentaire par rapport à celles logées à 30°C (Ganeshan et Chawla 2017). Le stress thermique augmente le volume de TA brun ainsi que son activité de thermogénèse adaptative (Vitali et al. 2012; Maloney et al. 2014; Karp 2012; Christopher J. Gordon

2017; J. M. David et al. 2013). Puisque le métabolisme basal et donc les dépenses énergétiques sont plus élevées, une diminution de la masse corporelle est observée (Dudele et al. 2015; Fischer, Cannon, et Nedergaard 2018; 2017; Ganeshan et Chawla 2017). Cette dépense énergétique élevée s'accompagne d'une adaptation du système respiratoire et cardiaque, avec une augmentation de la consommation d'oxygène (Dudele et al. 2015; Fischer, Cannon, et Nedergaard 2018; Trayhurn 1979; J. M. David et al. 2013) ainsi que de la pression sanguine et de la fréquence cardiaque (Swoap, Overton, et Garber 2004; Williams et al. 2002). Une température de 22°C s'accompagne également d'autres effets métaboliques. En effet, une température de 30°C améliore la tolérance au glucose et à la sensibilité à l'insuline comparée à une température de 20°C. L'étude de Martin et al. (2019) ne rapporte pas de variation de la BMAT entre des souris élevées à 22 ou 32°C, mais un plus grand volume de TA blanc ainsi qu'un taux de leptine plus élevé chez les souris à thermoneutralité. Plusieurs études ont également étudié l'effet de la Ta sur le système squelettique. Une Ta de 22°C résulte en une perte osseuse prématurée chez des souris mâles et femelles en croissance, qui est abolie à une Ta de 32°C. A thermoneutralité, les souris présentent également un plus haut taux de formation et un plus bas taux de résorption (Iwaniec et al. 2016; Martin et al. 2019). Récemment, Chevalier et al. ont démontré qu'une exposition à une température de 34°C améliorerait la structure osseuse chez les souris adultes mais également qu'elle prévenait la perte osseuse induite par ovariectomie (Chevalier et al. 2020).

Puisque les souris sont capables d'adopter des mécanismes comportementaux de conservation de chaleur, tels que la création d'un nid et se blottir les uns contre les autres, il a été suggéré que ces comportements puissent compenser les effets physiologiques du stress thermique observés à une température d'hébergement de 20°C. Cependant, il a été démontré qu'un hébergement groupé des animaux ainsi que la possibilité de construire un nid dans la cage, n'avaient qu'un effet très limité sur les effets du stress thermique au niveau des paramètres cardio-vasculaires et métaboliques. De même, solitaires ou en groupes, les souris vont préférer une Ta autour de 30°C à des Ta plus basses (Maher et al. 2015; C. J. Gordon, Becker, et Ali 1998).

Effectuer les expérimentations à une Ta inférieure à celle de la zone de thermoneutralité de la souris a donc de nombreux effets métaboliques et physiologiques mais altère également les résultats obtenus dans l'étude de certaines pathologies (Fig.12). Par exemple, Raun et al. (2020) rapporte un effet bénéfique de l'activité physique sur la composante métabolique de la souris seulement à une température basse de 22°C et pas à 30°C.

Table 1 Physiological characteristics and disease susceptibility of mice housed at different ambient temperatures			
Feature	Thermoneutrality	Sub-thermoneutrality	Refs
Temperature			
Ambient temperature	30°C	20–22°C	NA
Core temperature	37–38°C	37–38°C	NA
Cardiovascular characteristics			
Oxygen consumption (VO ₂)	~40 ml/h	~80 ml/h (approximately twice the rate of mice at an ambient temperature of 30°C)	35
Heart rate	~300 bpm	~550–600 bpm (approximately twice the rate of mice at an ambient temperature of 30°C)	35–37
Blood pressure (mean arterial pressure)	~75 mmHg	~105 mmHg	35
Metabolic disorders			
Obesity	Adipose tissue inflammation does not contribute to insulin resistance	Adipose tissue inflammation contributes to insulin resistance	65
Atherosclerosis	<ul style="list-style-type: none"> Increased atherogenic plaque burden and inflammation in the aorta of <i>Apoe</i>^{-/-} mice Development of atherogenic lesions in the aortic roots of C57BL/6J mice fed a Western diet 	<ul style="list-style-type: none"> Reduced disease in <i>Apoe</i>^{-/-} mice compared with those at an ambient temperature of 30°C C57BL/6J mice are resistant to atherogenesis when fed a Western diet 	65,72
Inflammation			
Infection	<ul style="list-style-type: none"> Improved survival following infection (viral, bacterial or protozoal) Febrile response following lipopolysaccharide injection 	<ul style="list-style-type: none"> Impaired survival following infection (viral, bacterial or protozoal) Transient hypothermia following lipopolysaccharide injection 	75–82
Cancer	<ul style="list-style-type: none"> Reduced tumour growth due to anti-tumour CD8⁺ T cell immune response Greater efficacy of chemotherapeutics compared with mice at an ambient temperature of 20–22°C 	Rapid tumour growth and persistence	89,90
Behaviour			
Food intake	Basal food consumption required to maintain homeostasis	Increased compared with mice at an ambient temperature of 30°C to support homeostasis and thermogenesis	8,10

Data are compiled from various listed references in which comparative analyses were carried out at two different ambient temperatures. bpm, beats per minute.

Figure 12 : Caractéristiques physiologiques et susceptibilité pathologique de souris logées à différentes températures ambiantes. D'après Ganeshan et Chawla (2017).

Plusieurs études se sont attelées à déterminer la véritable zone de thermoneutralité chez la souris. Suivant les auteurs, les températures proposées comme thermoneutres s'étendent de 25°C (Keijer, Li, et Speakman 2019) à 32°C (Fischer, Cannon, et Nedergaard 2019). Lorsqu'on laisse des souris choisir entre des cages à 30, 25 ou 20°C, elles vont instinctivement choisir de rester dans les cages à 30°C (Gaskill et al. 2009). Comme nous l'avons mentionné, la température standard de logement des souris a un large impact sur les résultats de certaines études et compromet fortement la transposition de ces résultats à l'humain. En effet, l'Homme, considéré comme étant en zone de thermoneutralité de manière constante, présente un ratio dépense énergétique quotidienne/taux métabolique basal (*c.-à-d* DEE/BMR, *Daily Energy Expenditure/Basal Metabolic Rate*) de 1.6. Or, une souris en condition standard de logement (*c.-à-d* 20°C) présente un ratio DEE/BMR de 3.1. Une Ta de 30°C permet d'abaisser ce ratio à 1.8, proche de l'humain, ce qui alignerait le métabolisme de la souris à celui de l'humain, et d'obtenir des résultats davantage transposables (Fischer, Cannon, et Nedergaard 2018). En se basant sur ce ratio DEE/BMR, Fischer, Cannon et Nedergaard, proposent une zone de thermoneutralité chez la souris de 28 à 32°C (Fischer, Cannon, et Nedergaard 2019). Keijer et al., suggèrent quant à eux qu'une température de 30°C est trop élevée. Ils ont effectué des mesures calorimétriques sur une plus longue

durée de 21.4 à 30.2°C, et ont obtenu un ratio DEE/BMR de 1.7 pour une Ta de 27.6°C et de 1.8 pour une Ta de 25.5°C.

Considérant la composante métabolique du tissu osseux, le métabolisme et la température pourraient avoir des effets importants sur la perte osseuse d'immobilisation. Hormis la BMAT, peu d'études HLU se sont intéressées à étudier le métabolisme lors de la perte osseuse. Pourtant, des modèles de microgravité terrestres tels que la dry-immersion ou le bed-rest ont mis en évidence le développement précoce d'une insulino-résistance, mais également un changement du métabolisme lipidique à la faveur d'un métabolisme glucidique (Linossier et al. 2017; Blanc et al. 2000). De plus, la grande majorité des études HLU sont effectuées à une température inférieure à la zone de thermoneutralité. Ces études pourraient donc rapporter des résultats sur la perte osseuse d'immobilisation comprenant les facteurs confondants du métabolisme et de la température. A ce jour, aucune étude HLU n'a comparé la perte osseuse d'immobilisation à une température thermoneutre et non thermoneutre.



Figure 13 : Illustration de Neil Smith (www.neilsmithillustration.co.uk). D'après Karp et al. (2012).

Sommaire et objectifs de recherche

La progression de la dégradation du système squelettique des astronautes une fois revenus sur Terre indique un sévère déconditionnement du mécanostat. En absence à ce jour de contre-mesures totalement efficaces, il est essentiel de comprendre les mécanismes biologiques sous-jacents de la perte osseuse en microgravité afin de pouvoir développer des stratégies de prévention ou des traitements efficaces, et ainsi envisager la viabilité de vols spatiaux de longues durées prévus dans le futur. La compréhension du déconditionnement osseux dans l'espace permettra également d'améliorer la compréhension du déconditionnement osseux pathologique sur Terre, qui devient une question de santé publique majeure avec le vieillissement général de la population et l'adoption d'un mode de vie de plus en plus sédentaire. L'utilisation du modèle murin HLU, qui reproduit la perte osseuse spatiale, a permis d'approfondir les mécanismes biologiques notamment par l'observation du comportement ostéocytaire. Bien que toutes les études HLU ont mis en évidence une mort ostéocytaire, les techniques d'analyse sont discutables et la littérature reste contradictoire concernant le rôle de la mort et des différentes molécules ostéocytaires. De plus, l'utilisation d'une température ambiante non thermoneutre altérant le métabolisme énergétique pourrait constituer un facteur cofondant dans les données existantes. Il est nécessaire d'étudier la perte osseuse d'immobilisation dans des conditions thermoneutres afin de pouvoir étudier les mécanismes biologiques résultant seulement du facteur mécanique.

Les objectifs de recherche de cette thèse sont les suivants :

- Identifier et décrire la séquence d'apparition des variations dans les éléments suivants : masse et architecture osseuse, activités cellulaires et comportement ostéocytaire.
- Identifier le rôle des ostéocytes dans la perte osseuse d'immobilisation.
- Identifier et décrire le rôle de la température ambiante sur la physiologie des souris dans le modèle HLU.
- Identifier et décrire l'impact de la température ambiante sur les différents paramètres osseux dans le modèle HLU.
- Valider un modèle HLU robuste en minimisant les effets confondants.

Matériel et méthode

1. Expérimentation animale.....	44
1.1 Animaux.....	44
1.2 Conditions expérimentales.....	44
1.3 Design expérimental.....	47
2. Modèle murin de suspension (HLU).....	48
2.1 Cages de suspension.....	48
2.2 Mise en suspension des souris.....	49
3. Analyses tomographiques (μ CT).....	51
3.1 Acquisitions et analyses <i>in vivo</i> des paramètres trabéculaires.....	51
3.2 Acquisitions et analyses <i>ex vivo</i> des paramètres corticaux.....	52
4. Analyses histomorphométriques.....	54
4.1 Préparation des échantillons.....	54
4.2 Mesures histomorphométriques.....	55
5. Analyses de la BMAT par marquage osmium.....	58
6. Analyses moléculaires.....	59
7. Dosages ELISA.....	60
8. Analyses de la densité ostéocytaire et des lacunes vides.....	61
9. Analyses du réseau lacuno-canaliculaire et ostéocytaire.....	63

1. Expérimentation animale

1.1 Animaux

Les recherches de cette thèse s'inscrivent dans la continuité de la mission Bion M1 et dans la préparation de la mission Bion M2. Des animaux identiques sont donc utilisés pour cette étude, c'est-à-dire des souris C57BL/6J mâles âgés de 4 mois. De plus, la souche murine C57BL/6J (B6) est très étudiée dans le cadre de recherche sur la perte osseuse induite par une décharge mécanique. En effet, ces souris sont génétiquement prédisposées à la perte osseuse. Elles présentent une BMD fémorale inférieure de 53% comparée à la souche murine C3H/HeJ (C3H) pour une masse corporelle et une taille de fémur similaires (Beamer et al. 1996). Les souris B6 présentent également une activité de formation inférieure et une activité de résorption supérieure aux souris C3H (Sheng et al. 1999; Amblard et al. 2003; Linkhart et al. 1999). Les souris B6 présentent également une mécanosensibilité osseuse plus élevée (Amblard et al. 2003; Umemura et al. 2002; Kodama et al. 2000). Les souris C57BL/6J sont donc des candidats idéaux à la perte osseuse induite par décharge mécanique. Un âge de 4 mois chez ces souris est couramment utilisé au sein des études HLU et correspond à leur pic de densité osseuse (BMD) (Beamer et al. 1996). Il est alors considéré comme représentatif de la maturité squelettique d'un jeune adulte chez les humains.

Cette étude est menée sur des souris mâles de souche C57BL/6J âgées de 4 mois provenant de Charles River Laboratories (Saint-Germain Nuelles, France). Le logement et l'ensemble du protocole expérimental animal ont lieu au sein de la Plateforme d'Expérimentations et Analyses (PLEXAN) de la Faculté de Médecine Jacques Lisfranc de l'Université Jean-Monnet de Saint-Etienne. Les souris sont âgées de 16 semaines à l'arrivée en animalerie (poids, g: 28.7 ± 1.9). Suite à une période d'acclimatation de 4 semaines, les souris sont appariées deux à deux selon leur poids puis réparties aléatoirement au groupe contrôle « CONT » ou au groupe suspendu « HLU ». Les souris CONT et HLU effectuent alors respectivement une période d'activité normale ou de suspension de 5 ou 14 jours.

1.2 Conditions expérimentales

Acclimatation

Le transport des animaux provoque un stress associé à de multiples modifications physiologiques pouvant influencer les résultats des recherches si l'homéostasie n'a pas été rétablie avant le début de l'expérimentation. C'est pourquoi une période d'acclimatation suivant l'arrivée des animaux à l'animalerie est généralement recommandée. Parmi les études HLU existantes, une période d'une semaine est classiquement effectuée pour l'acclimatation des souris (Tableau 2). Cependant, bien que les taux de corticostérone reviennent à la normale sous 2 jours suite au transport, la diminution du poids

corporel persiste jusqu'à 7 jours. D'autres paramètres physiologiques, comme par exemple les baisses de performances de reproduction, peuvent persister jusqu'à un mois. Notre protocole expérimental nécessite une adaptation des souris à l'isolement, à leur cage, et à la température ambiante. Une période d'acclimatation de 4 semaines semble être approprié et permet une adaptation progressive de la souris à son environnement. En effet, les enrichissements environnementaux tels que du bois à ronger et de la paille pour créer un nid, ne peuvent persister pendant la période expérimentale de suspension. La souris suspendue peut s'en servir pour reposer ses pattes arrières, altérant alors les conditions requises de la décharge mécanique. Ces enrichissements sont donc ôtés à la moitié de la période d'acclimatation pour une adaptation progressive à leur environnement final.

Conditions d'hébergement

Le protocole de suspension nécessite des cages spécifiques qui ne permettent de loger qu'une seule souris, rarement deux (Tableau 2). Or, l'isolement d'une souris n'est pas sans conséquences. Il induit tout d'abord un isolement social pouvant provoquer un stress chez la souris, mais également l'impossibilité de pouvoir se blottir contre des congénères pour se réchauffer. La suspension nécessite également la présence dans la cage d'une grille par-dessus la litière afin que la souris puisse se déplacer facilement, mais qui l'isole d'une source de chaleur. Il est donc important que les souris contrôles soient logées dans les mêmes conditions, c'est-à-dire qu'elles soient également logées individuellement avec un environnement de cage identique aux souris suspendues. Ces conditions ne sont pas systématiquement respectées ou ne sont pas spécifiées parmi les études HLU existantes (Tableau 2).

Consommation alimentaire et poids corporel

Pendant la période d'acclimatation, les souris sont visitées 3 fois par semaine afin de contrôler leur poids et leur consommation alimentaire. Pendant la période de suspension, ces paramètres sont relevés quotidiennement entre 9h et 10h.

De plus, il est connu que la suspension des souris provoque une diminution de la consommation alimentaire dans les premiers jours. Or, celle-ci influe la masse osseuse et la BMAT. En effet, une restriction alimentaire est associée à une perte osseuse ainsi qu'à une expansion de la BMAT chez le modèle murin et l'humain (Cawthorn et al. 2016; Devlin 2011; Grinspoon et al. 1995; Bredella et al. 2009). Afin d'éliminer une possible différence de consommation alimentaire entre les souris suspendues et les souris contrôles, un appariement alimentaire (*pair-feeding*) est effectué. A la fin de la période d'acclimatation chaque souris contrôle est appariée à une souris suspendue en fonction du poids corporel le plus proche. Lors du protocole de suspension, la souris contrôle reçoit chaque jour la quantité de nourriture consommée la veille par sa souris suspendue appariée.

Tableau 2 : Comparatif des conditions expérimentales parmi les études HLU existantes.
sem. = semaine(s), *ns* = information non spécifiée, *Ta* = température ambiante.

Etude	Animaux	Durée HLU	Ta	Durée acclimatation	# souris/cage	pair-feeding
Aguirre et al., 2006	Souris Swiss Webster femelles âge ns	1, 3, 7, 18 jours	20°C	non	2HLU/cage 5CONT/cage	oui
Amblard et al., 2003	Souris C3H/HeJ et C57Bl/6J mâles 16 sem.	7, 14, 21 jours	23°C	1 sem.	1/cage	non
Baek et al., 2009	Rats Sprague-Dawley mâles 6 mois	28 jours	22°C	1 sem.	1/cage	oui
Basso et Heersche, 2006	Rats Fischer mâles 5 sem.	14 jours	ns	1 sem.	1/cage	oui
Boudignon et al., 2007	Rats Sprague-Dawley mâles 3 sem.	28 jours	ns	ns	ns	oui
Cabahug-zuckerman et al., 2016	Souris C57BL/6J mâles 4 mois	5 et 14 jours	25°C	non	1/cage	non
Colaïanni et al., 2017	Souris C57BL6 mâles 2 mois	28 jours	ns	non	1/cage	oui
Cunningham et al., 2018	Rats Fischer Brown Norway mâles 9 ou 28 mois	14 jours	22°C	non	1/cage	non
Ellman et al., 2014	Souris C57BL/6J femelles 11 sem.	21 jours	22°C	non	1HLU/cage CONT groupés	non
Ichinose et al., 2004	Rats Wistar mâles 36 sem.	10 jours	ns	1 sem.	1/cage	ns
Kawao et al., 2018	Souris C57BL/6J mâles 12 sem.	21 jours	ns	non	ns	non
Lin et al., 2009	Souris C57BL/6J femelles 7 ou 17 sem.	14 jours	ns	non	1/cage	ns
Macias et al., 2011	Rats Sprague-Dawley mâles 6 mois	28 jours	23°C	14 jours	1/cage	non
Matsumoto et al., 1998	Rats Sprague Dawley mâles 4 sem.	14 jrs	24°C	1 sem.	1/cage	oui
Metzger et al., 2017	Rats Sprague Dawley mâles 7 mois	28 jours	23°C	8 sem.	1/cage	ns
Momken et al., 2011	Rats Wistar mâles 240-250g	14 jours	21°C	1 sem.	1/cage	non
Peres-Ueno et al., 2017	Rats Wistar femelles 5-6 mois	21 jours	22°C	ns	ns	ns
Plotkin et al., 2015	Souris C57BL/6 femelles 4 mois	ns	20°C	2 sem.	2/cage	oui
Saxena et al., 2011	Souris BALB/c mâles 6-7 sem.	28 jours	24°C	1 sem.	1/cage	non
Siu et al., 2013	Rats Sprague Dawley mâles et femelles 3 mois	28 jours	25°C	1 sem.	ns	non
Spatz et al., 2013	Souris C57BL/6J femelles 12 sem.	21 jours	22°C	ns	ns	non
Swift et al., 2014	Rats Sprague-Dawley mâles 6 mois	28 jours	23°C	2 sem.	ns	non
Zhang et al., 2016	Rats Sprague-Dawley femelles 4 mois	35 jours	ns	2 jours	1/cage	non

Température ambiante

Dès leur arrivée à l'animalerie, les souris sont logées dans une pièce à une température ambiante de 22 ou 28°C. La température de 22°C correspond à la température standard d'une animalerie alors que la température 28°C correspond à une température médiane entre les deux estimations de thermoneutralité chez la souris de l'étude de Fischer, Cannon et Nedergaard et l'étude de Keijer et al. La température ambiante de la pièce est contrôlée deux fois par jour afin de s'assurer qu'elle ne s'éloigne pas de la température cible de plus de 1°C.

Approbation éthique et bien-être animal

Le modèle animal ainsi que toutes les procédures ont été approuvés par le comité d'éthique local (201611231457342-V6, CEEAL-UJM No 98, Saint Étienne, France ; Annexe méthodologique 1). Dans ce protocole animal, les souris sont isolées et immobilisées pour une longue durée, il est donc classé sévère. La visite des animaux ainsi que le relevé de la consommation alimentaire et du poids corporel permettent un suivi du bien-être animal quotidien, permettant également la détection d'éventuels signes de souffrances. Aucun animal n'a été exclu de l'étude en cours de protocole pour avoir atteint le point limite, soit une perte de poids $\geq 20\%$ par rapport au poids initial.

1.3 Design expérimental

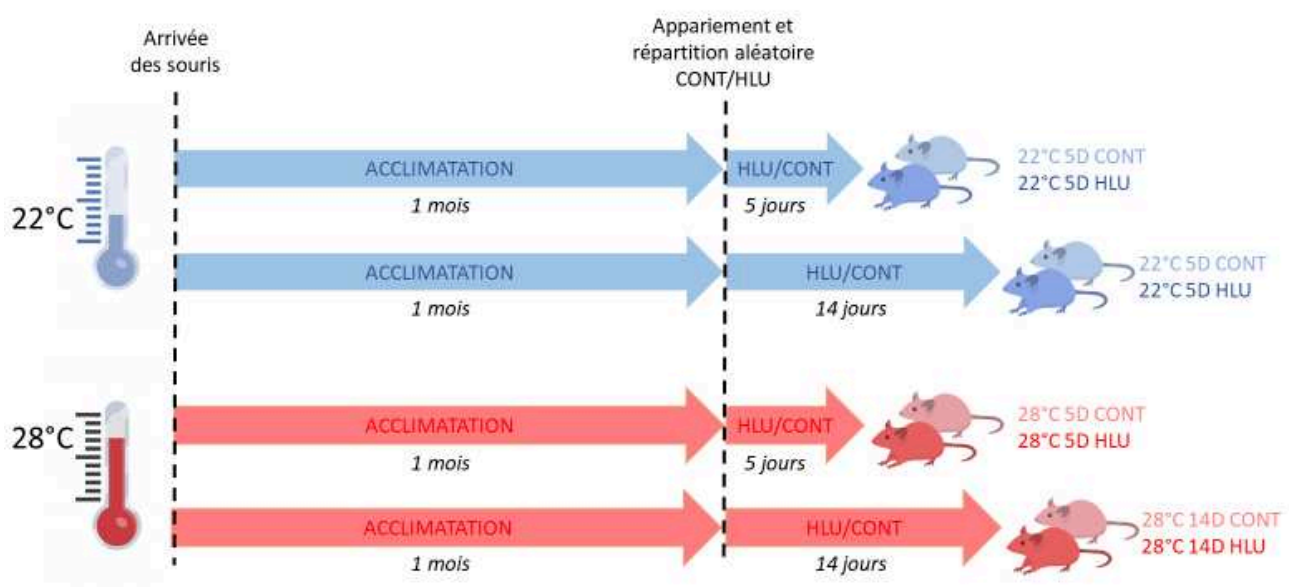


Figure 1 : Schéma récapitulatif du design expérimental.

2. Modèle murin de suspension (HLU)

2.1 Cages de suspension

Ces cages personnalisées ont été manufacturées pour les expérimentations de suspension chez la souris. Elles ont été modifiées à partir de précédents prototypes afin d'améliorer l'environnement de suspension. Après une expérimentation initiale de suspension, il a été observé que les souris grimpaient et restaient sur les bouteilles d'eau placées à l'intérieur des cages. En déplaçant la bouteille d'eau à l'extérieur de la cage, la souris ne peut alors plus grimper sur aucune structure et placer du poids sur les membres postérieurs.

La cage est composée des différents composants suivants (Figure 2):

1. Fond de cage en Perspex® (200mm x 310mm x 125mm)
2. Pièce du surélévément en acier inoxydable (190mm x 305mm x 115mm)
3. Grille en acier inoxydable pour le fond de la cage (160mm x 260mm x 2mm)
4. Couverture grillagée en acier inoxydable (200mm x 310mm x 25mm)
5. Tige en acier inoxydable pour l'attachement de la queue (3mm x 140mm x 2mm)
6. Bouteille d'eau en plastique (75 mL)
7. Deux tiges en acier inoxydable (320mm, 4mm de diamètre)
8. Trolley en acier inoxydable

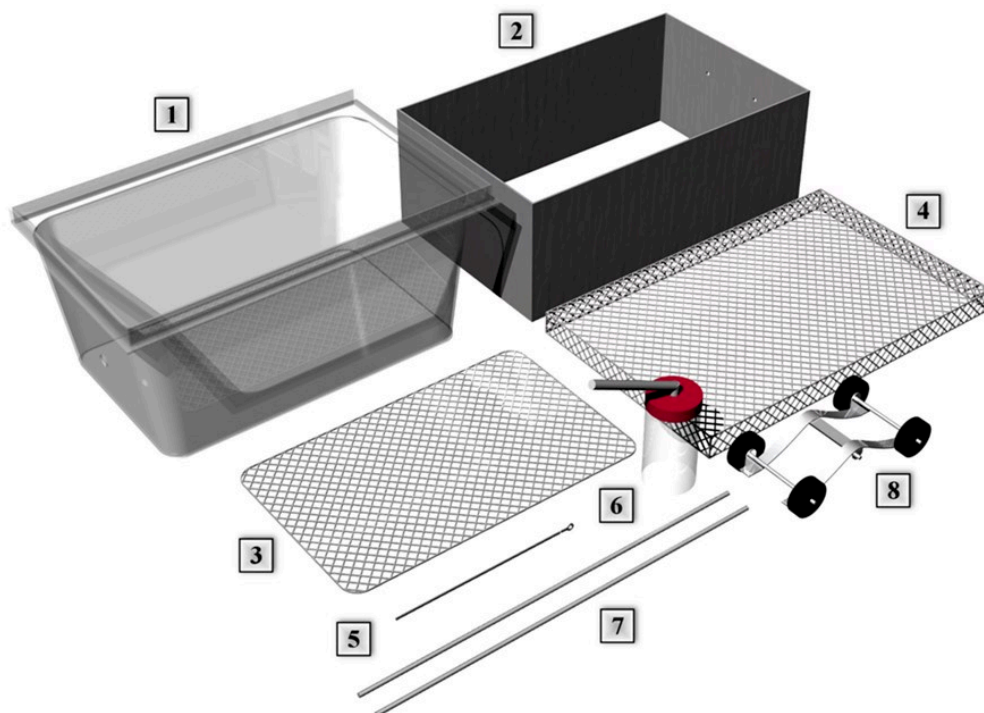


Figure 2 : Composants de la cage de suspension.

La litière est placée au fond du composant Perspex et est recouvert de la grille métallique. La souris peut alors s'accrocher avec les pattes avant et se déplacer librement dans la cage. La présence de la grille empêche également la souris de ne pas former des amas sur lesquels elle pourrait reposer ses pattes arrières et altérer alors la consistance de la décharge mécanique. Les croquettes de nourriture sont déposées directement sur la grille. Le trolley coulisse sur les deux tiges métalliques traversant le haut de la cage et est relié par un émerillon à la tige métallique sur laquelle on attache la queue de la souris (Figure 3). Celle-ci peut alors se tourner à 360° et se déplacer librement dans l'ensemble de la cage.

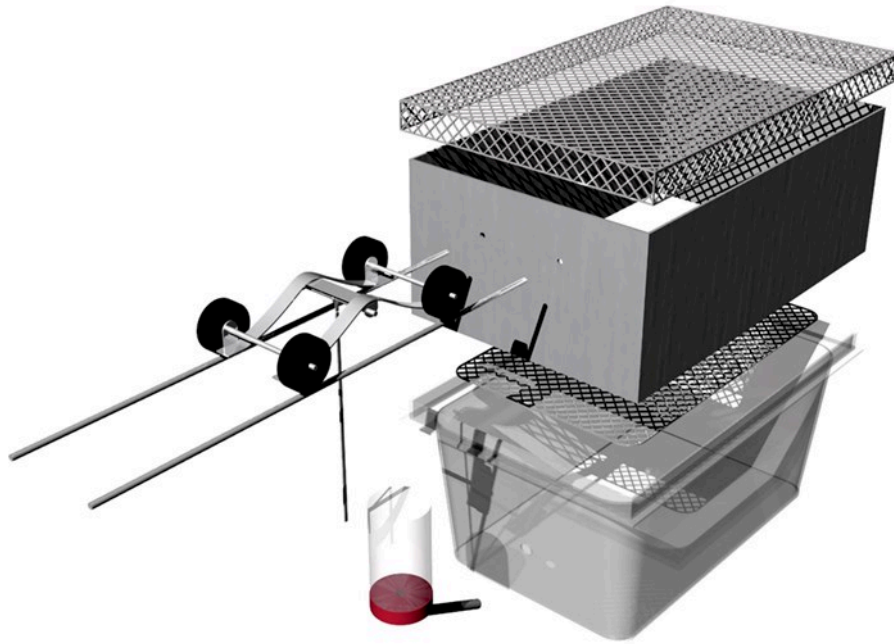


Figure 3 : Assemblage de la cage de suspension.

2.2 Mise en suspension des souris

La mise en suspension des souris s'effectue sous anesthésie gazeuse (isoflurane 2%). La tige métallique sur laquelle est fixée la queue est recouverte au préalable d'un bandage élastique de type Tensoplast afin de minimiser les irritations. Trois bandelettes de ce même bandage sont découpées puis appliquées de manière à entourer la queue et la tige métallique. Suite au réveil de l'animal, la tige métallique est reliée au trolley qui est ensuite installé dans la cage de suspension. La hauteur du trolley est ajustée de manière à obtenir un angle de 30° entre la colonne vertébrale et le fond de la cage, respectant la répartition naturelle du poids corporel de la souris, c'est-à-dire 50-50 entre les membres antérieurs et la queue (Fig.4). L'angle de suspension est de nouveau adapté environ une heure après la mise en suspension, lorsque la posture de la souris est détendue. Il est également vérifié de manière quotidienne pendant toute la période du protocole de suspension. Le trolley et la présence d'un goupillon

au niveau de la tige d'attachement de la queue permet à la souris une mobilité à 360°C et un déplacement dans l'ensemble de la cage en s'agrippant à la grille. Pour dormir, les animaux se reposent sur le côté (pattes avant au repos) et leur sommeil ne semble pas perturbé. Lors de la mise en suspension, un relevé du poids de la souris est effectué sans, puis avec l'appareillage de suspension, permettant le suivi de la courbe de poids pendant le protocole de suspension. Le protocole détaillé de la mise en suspension se trouve en Annexe méthodologique 2.

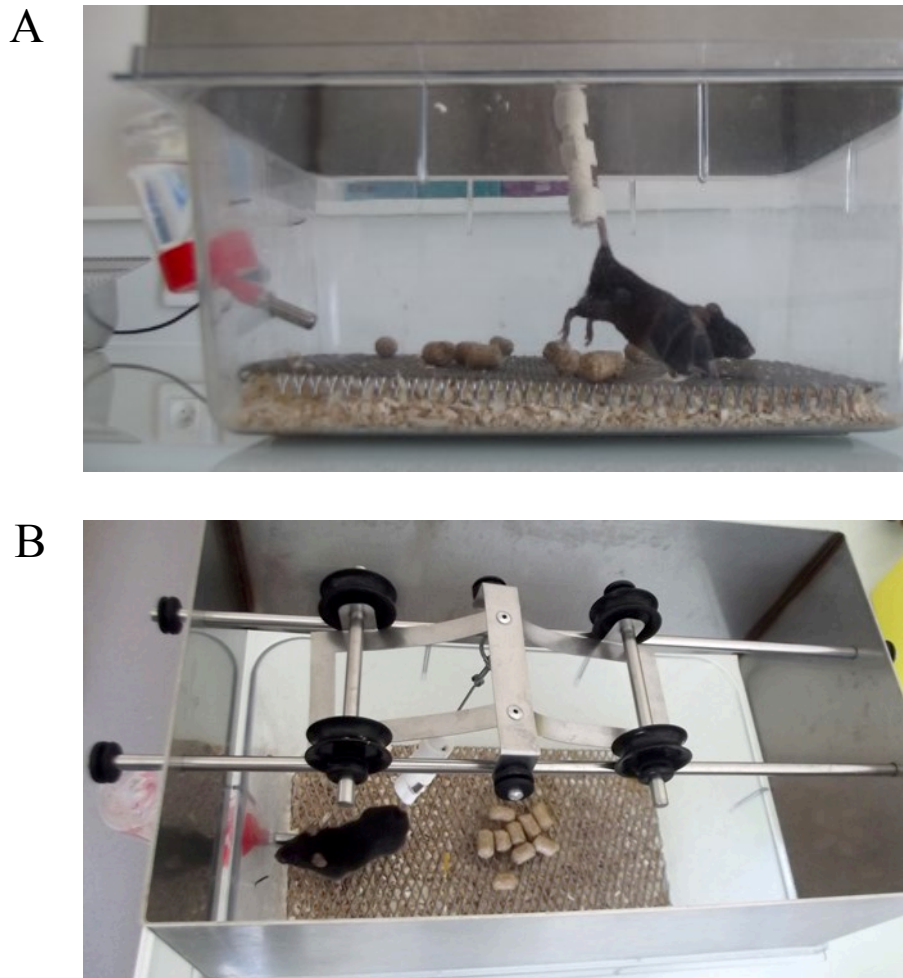


Figure 4 : Souris mise en suspension. Vue de dessus (A), vue de profil (B).

3. Analyses tomographiques (μ CT)

3.1 Acquisitions et analyses *in vivo* des paramètres trabéculaires

Des scans μ CT (*μ -Computerized Tomography*) *in vivo* ont été effectués lors de la dernière semaine de l'acclimatation et le jour final du protocole (c.-à-d. J5 ou J14), permettant une analyse longitudinale de l'évolution des paramètres trabéculaires. L'acquisition est effectuée au niveau du genou, comprenant la métaphyse distale du fémur et la métaphyse proximale du tibia (Fig.5) grâce à un scanner à rayons X vivaCT 40 (Scanco Medical, Bassersdorf, Suisse) avec les paramètres suivants : 70 kV, 114 μ A, voxel 10.5 μ m³, temps d'exposition 250 ms, taille d'ouverture 21.5 mm. Le scan des animaux s'effectue sous anesthésie gazeuse (isoflurane 2%). Le protocole d'acquisition *in vivo* est détaillé en Annexe méthodologique 3.1.

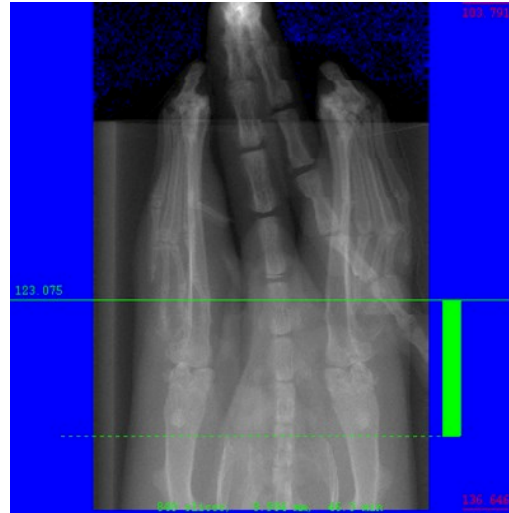


Figure 5 : Scout-view au niveau des membres inférieurs. La ROI s'acquisition est délimitée par les traits verts.

Les paramètres osseux trabéculaires sont analysés au niveau de la métaphyse distale du fémur et de la métaphyse proximale du tibia grâce au programme d'évaluation μ CT v6.6 (Scanco Medical, Bassersdorf Switzerland). Une ROI de 630 μ m d'épaisseur (60 images consécutives) est déterminée au-delà de toute évidence de plaque de croissance (Fig.6).

Cette analyse 3D de l'architecture trabéculaire permet d'obtenir les paramètres suivants :

- BV/TV (%) : volume trabéculaire rapporté au volume total.
- Conn.D (1/mm³) : nombre de connexion inter-trabéculaires par mm³ de volume total.
- Tb.N (1/mm) : nombre de trabécules.
- Tb.Th (mm) : épaisseur des trabécules.
- Tb.Sp (mm) : distance inter-trabéculaires.



Figure 6 : ROIs analysées pour les paramètres trabéculaires du fémur et du tibia.

Le protocole détaillé des analyses d'images μ CT *in vivo* se trouve en Annexe méthodologique 3.2.

3.2 Acquisitions et analyses *ex vivo* des paramètres corticaux

L'acquisition *in vivo* de la longueur totale du fémur et du tibia n'est pas possible au regard de la durée des acquisitions μ CT. De plus, la perte osseuse corticale étant bien plus faible que la perte osseuse trabéculaire dans le modèle HLU, une analyse de différents sites osseux est intéressante. Une acquisition μ CT *ex vivo* des fémurs et des tibias entiers est donc effectué en fin de protocole. Les paramètres d'acquisition des images sont identiques à ceux des acquisitions *in vivo* : 70 kV, 114 μ A, voxel 10.5 μ m³, temps d'exposition 250 ms, taille d'ouverture 21.5 mm. Le protocole détaillé des acquisitions μ CT *ex vivo* se trouve en Annexe méthodologique 3.3.

L'architecture corticale du fémur est évaluée au niveau de 3 ROIs (Fig.7) :

- A 25% de la longueur totale du fémur = métaphyse distale.
- A 50% de la longueur totale du fémur = mid-diaphyse.
- A 75% de la longueur totale du fémur = métaphyse proximale.

L'architecture corticale du tibia est évaluée au niveau de 4 ROIs (Fig.7) :

- 2 mm en dessous de la plaque de croissance (1).
- A 50% de la longueur totale de la fibula (2).
- A 50% de la longueur totale du tibia (3).
- 1 mm au-dessus de la jonction distale tibia-fibula (4).

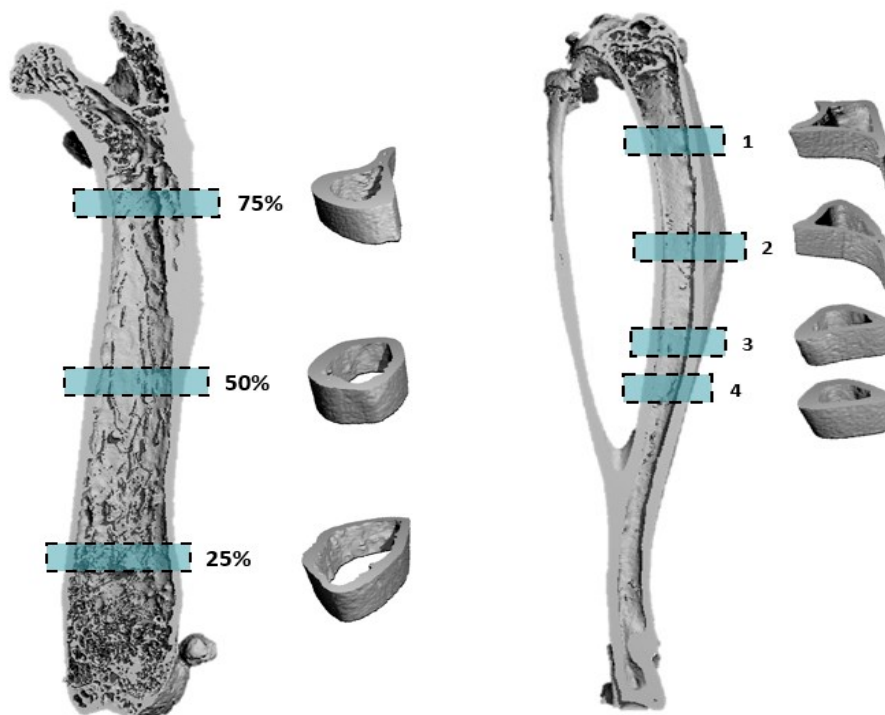


Figure 7 : ROIs analysées pour les paramètres architecturaux corticaux du fémur et du tibia.

Chaque ROI est analysée en 3D sur une épaisseur de 630 μ m (60 images consécutives) grâce au programme d'évaluation μ CT v6.6 (Scanco Medical, Bassersdorf Switzerland), et permet d'obtenir les paramètres architecturaux suivants :

- CT.Th (mm) : épaisseur corticale moyenne.
- vBMD (mg HA/cm³) : densité minérale osseuse volumétrique.
- Vox-TV (mm³): volume total.
- Vox-BV (mm³) : volume osseux cortical.

A partir de ces paramètres obtenus automatiquement, les paramètres suivants sont calculés :

- Md.Ar (mm²) : aire médullaire moyenne = (Volume total – Volume osseux cortical)/0.63
- Ct.Ar (mm²) : aire corticale moyenne = Volume osseux cortical/0.63

Le protocole d'analyse d'image effectuée est détaillé en Annexe 3.4.

4. Analyses histomorphométriques

4.1 Préparation des échantillons

Injections et conditionnement des échantillons osseux

Pour les analyses histomorphométriques, deux injections intra-péritonéales de tétracycline (25mg/kg) sont effectuées au cours de la période de suspension/contrôle : à J7 et J12 pour le protocole de 14 jours et à J1 et J4 pour le protocole de 5 jours (Annexe méthodologique 4.1). La tétracycline est un antibiotique aux propriétés fluorescentes qui se lie aux ions calciums libres. La tétracycline se retrouve ainsi incluse dans l'os nouvellement minéralisé et permet d'analyser les paramètres dynamiques de formation osseuse. Le jour final du protocole, les souris sont anesthésiées (isoflurane 2%) puis mises à mort par dislocation cervicale. Une transfusion cardiaque de paraformaldéhyde (PFA 4% #HT501128, Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, Etats-Unis) est ensuite effectuée, puis les fémurs prélevés et progressivement déshydratés (Annexe méthodologique 4.2).

Inclusion des fémurs en MMA

Les fémurs déshydratés sont coupés au tiers distal grâce à une scie diamantée de précision (Escil, Chassieu, France) puis stocké dans une solution de méthylméthacrylate (MMA) pendant 2 semaines à -20°C. Suite à cette imprégnation, l'os est de nouveau stocké 48h à -20°C dans une solution MMA et d'un petit volume de catalyseur composé d'isopropanol et de N,N-diméthylaniline. Le fémur est ensuite définitivement inclus en MMA solide suite à un stockage d'une nuit à -4°C dans une solution de MMA et d'un gros volume de catalyseur (Annexe méthodologique 4.3).

Préparation des sections histologiques et colorations

Les blocs de MMA contenant un fémur sont polis mécaniquement (ESC 200 GTL, ESCIL, Chassieu, France) afin de les préparer à un plan de coupe longitudinal. Des sections de 9µm d'épaisseur sont ensuite effectuées sur un microtome SM250E (Leica, Wetzlar, Allemagne) (Annexe méthodologique 4.4). Des sections blanches sont directement montées entre lames et lamelles pour les analyses des marquages tétracycline. Une coloration TRAP ou Goldner modifié est ensuite effectuée sur les autres sections avant d'être montées entre lames et lamelles (Annexe méthodologique 4.5). La coloration TRAP est une technique histo-enzymatique permettant de révéler les ostéoclastes actifs. L'enzyme phosphatase acide tartrate-résistante (TRAP) consomme le substrat naphthol et produit un composé qui est coloré par du Fast Violet. Une contre-coloration bleu aniline met en évidence le tissu osseux minéralisé (Figure X). La coloration trichome de Goldner repose sur une différence de

perméabilité des tissus aux colorants. La moelle osseuse est alors colorée en rouge clair, le tissu ostéoïde en rouge foncé et le tissu minéralisé en vert (Figure X).

4.2 Mesures histomorphométriques

Paramètres trabéculaires

Les paramètres trabéculaires tels que le BV/TV et le Tb.Th sont mesurés au grossissement x50 (Microscope Leitz DMRB, Leica, Wetzlar, Allemagne) sur les sections histologiques colorées au Goldner modifié à l'aide du logiciel d'analyses histomorphométriques Bone v.3.50 (Explora Nova, La Rochelle, France). La ROI analysée est délimitée au niveau de la métaphyse distale incluant l'os trabéculaire et excluant l'os cortical (Fig.8). Un seuillage manuel est utilisé pour détecter les différentes trabécules comprises dans la ROI et les paramètres BV/TV et Tb.Th sont calculés automatiquement. Ces mesures sont effectuées sur 5 sections non sériées et la moyenne de chaque paramètre est utilisé pour normaliser les paramètres ostéoclastiques et les paramètres de formation dynamiques.

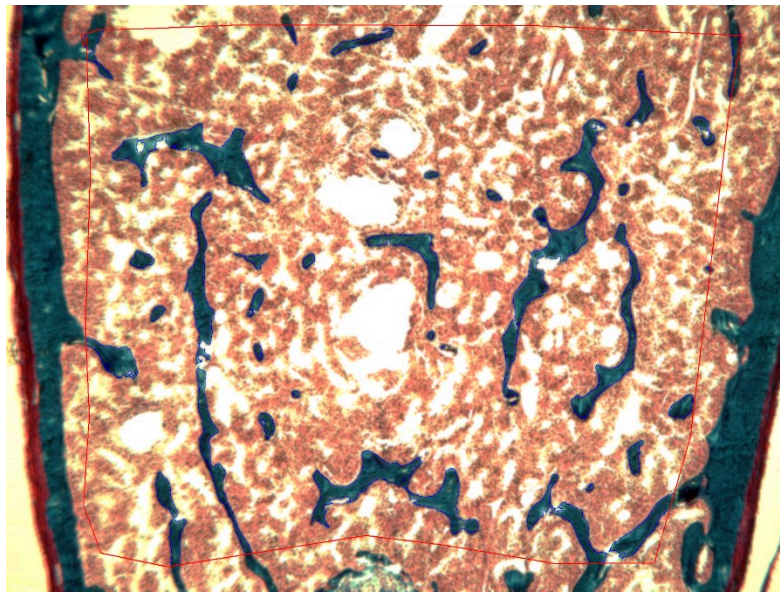


Figure 8 : ROI (délimitée en rouge) et seuillage pour l'analyse des paramètres trabéculaires sur les sections colorées au Goldner modifié. Photographie personnelle (Microscopie fond clair, x50).

Paramètres ostéoclastiques

Les paramètres ostéoclastiques sont mesurés au grossissement x200 (Microscope Axio Scope.A1, Carl Zeiss, Oberkochen, Allemagne) sur les sections histologiques colorées à la TRAP à l'aide d'un logiciel interne de mesures morphométriques. Les surfaces osseuses en contact d'un ostéoclaste sont surlignées individuellement à l'aide d'une table digitale Summasketch III (Summagraphics, Paris, France) (Fig.9). Les mesures sont effectuées sur 4 ROIs au niveau de la

métaphyse distale. Cinq lames non sériées sont analysées pour chaque souris. Les paramètres suivants sont obtenus :

- Oc.S/BS (%) : surface ostéoclastique rapportée à la surface osseuse.
- N.Oc/B.Ar (#/mm²) : nombre d'ostéoclaste pour 1mm² d'aire osseuse.
- N.Oc/B.Pm (#/mm) : nombre d'ostéoclaste pour 1mm de surface osseuse.
- Oc.L (μm) : longueur moyenne d'un ostéoclaste.

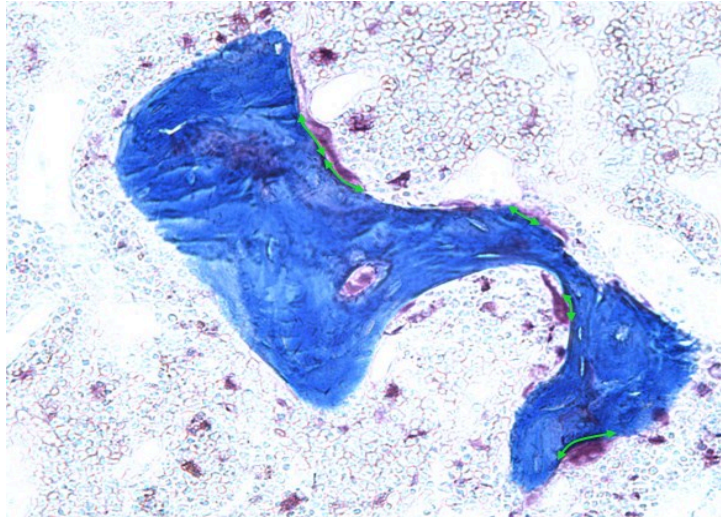


Figure 9 : Mesures des surfaces ostéoclastiques sur les sections colorées au TRAP. Les mesures sont représentées par les flèches vertes. Les ostéoclastes apparaissent en violet foncé et le tissu minéralisé en bleu. Photographie personnelle (Microscopie fond clair, x200).

Paramètres de formation dynamique

Les paramètres de formations dynamiques sont mesurés au grossissement x200 (Microscope Axio Scope.A1, Carl Zeiss, Oberkochen, Allemagne) sur les sections histologiques blanches à l'aide du logiciel interne de mesures morphométriques. Les doubles marquages tétracycline sont surlignés à l'aide de la tablette graphique (Fig 10B). Les mesures sont effectuées sur 4 ROIs au niveau de la métaphyse distale sur cinq lames non sériées pour chaque souris. On obtient le paramètre dLS/BS (%) : surface doublement marquée rapportée à la surface osseuse. Pour évaluer la vitesse et le taux de formation osseuse, quatre mesures équidistantes de l'épaisseur sont effectuées pour chaque double marquage (Fig.10A). Les mesures sont effectuées au sein des mêmes ROIs jusqu'à ce que la moyenne ne varie plus. On obtient alors le paramètre MAR (μm/jr) : taux d'apposition minéral. Le taux de formation osseuse, BFR (μm/jr) est obtenu avec le calcul suivant : $(dLS/BS \times MAR)/100$.

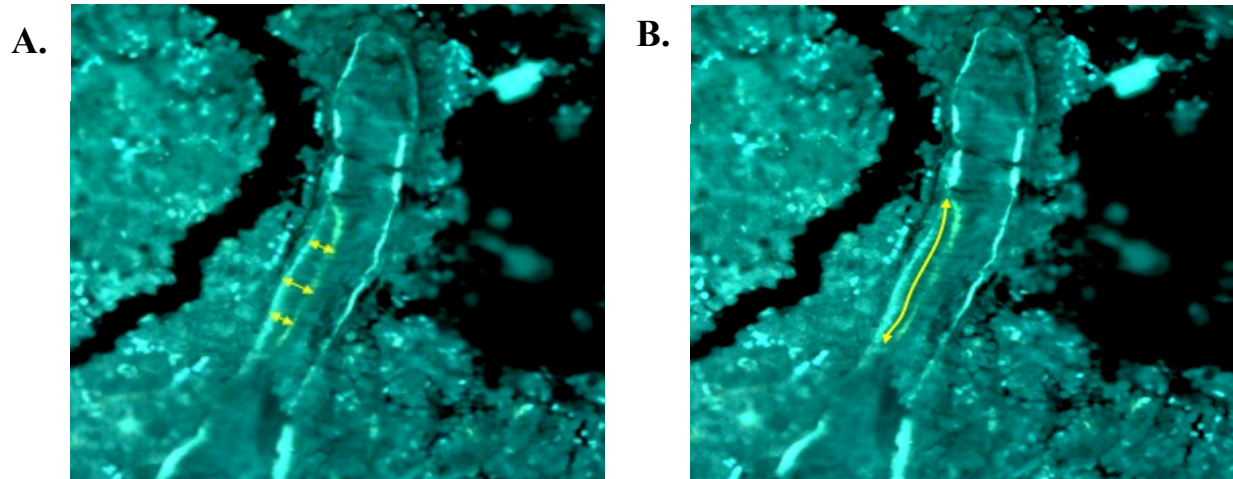


Figure 10 : Mesures de la MAR (A) et des surfaces doublement marquées (B) sur les sections tétracycline. Les mesures sont représentées par les flèches jaunes. Le marquage tétracycline le plus ancien apparait en jaune et le plus ancien en cyan. Photographie personnelle (Microscopie filtre UV, x200).

5. Analyses de la BMAT par marquage osmium

Le tétrioxide d'osmium (OsO_4) est la forme la plus oxydée de l'élément chimique osmium, qui appartient à la famille des métaux de transition. Le tétrioxide d'osmium se dissout dans le gras et forme un composé réduit noir, l'oxyde d'osmium, par formation de doubles liaisons éthylènes avec les acides gras insaturés. L'oxyde d'osmium étant visible aux rayons X, il est alors possible de quantifier le volume d'adipocytes médullaires via une analyse μCT .

Les tibias sont décalcifiés, sectionnés au niveau de la jonction distale tibia-fibula, puis incubés dans une solution de tétrioxide d'osmium 2% et potassium dichromate 5%, 72h à température ambiante. Une acquisition μCT de 630 μm épaisseur est ensuite effectuée au niveau de la métaphyse proximale (Scanco Medical, Bassersdorf, Switzerland). L'analyse 3D de ce volume grâce au programme d'évaluation μCT v.6.6 permet d'obtenir le volume de BMAT en mm^3 ainsi que le volume de BMAT normalisé au volume métaphysaire (%). Le protocole détaillé du marquage osmium et des analyses μCT se trouvent en Annexe méthodologique 5.

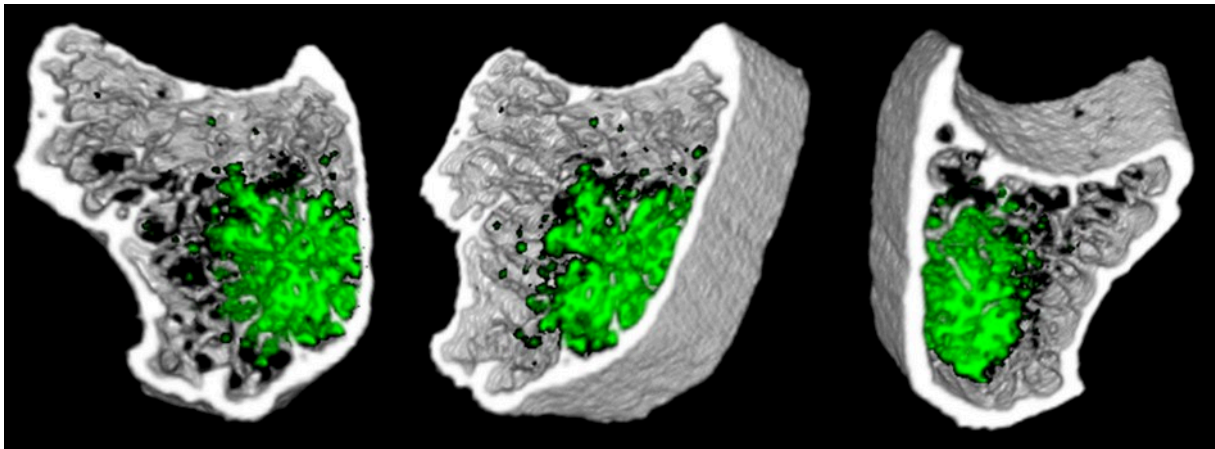


Figure 11 : Représentation du volume analysé pour la détection de la BMAT marquée à l'osmium. En gris, le tissu osseux calcifié. En vert, la BMAT.

6. Analyses moléculaires

Collecte des échantillons et préparation des lysats tissulaires

Les échantillons destinés aux analyses moléculaires sont collectés au jour final du protocole. Le fémur et le tibia sont collectés en condition stérile puis la moelle osseuse est flushé au PBS afin de pouvoir évaluer les taux d'expressions géniques sur les deux compartiments séparément. Les échantillons de cortex sont directement stockés à -80°C dans des cryotubes. La moelle flushée au PBS est centrifugée puis le culot est resuspendu dans du Trizol avant d'être stockée à -80°C. La collecte des échantillons est détaillée en Annexe X. Pour les échantillons de cortex, un broyage mécanique est effectué à l'aide d'un homogénéisateur broyeur vibrant Mikro-Dismembrator S (Sartorius AG, Göttingen, Allemagne), avant d'être resuspendu dans du Trizol (Annexe méthodologique 6.1).

Extraction, purification et rétrotranscription des ARNs

Les ARNs des échantillons sont extraits par affinité chimique par bains de chloroforme et d'isopropanol (Annexe). Les ARNs sont ensuite purifiés à l'aide de colonnes de rétention ADN et ARN du kit RNeasy Plus Mini (Qiagen, Hilden, Allemagne) (Annexe X). L'intégrité et la concentration des extraits ARN purifiés sont analysés par le système Experion™ Automated Electrophoresis (BioRad, Hercules, Californie, Etats-Unis). La concentration en ARN des échantillons est ensuite quantifiée par fluorimétrie Ribogreen à l'aide d'une gamme étalon (Kit et réactifs Quant-iT™ RiboGreen® RNA) (Annexe X). Une réaction de rétro-transcription est ensuite effectuée à partir de 1 ou 2 µg d'ARN purifié à l'aide du kit Kit iScript™ cDNA Synthesis Kit (BioRad, Hercules, Californie, Etats-Unis) (Annexes méthodologiques 6.2, 6.3, 6.4, 6.5).

Analyse des taux d'expression par RT-PCR

Le taux d'expression des gènes cibles est évalué par RT-PCR (*Real-Time Polymerase Chain Reaction*) à l'aide du kit LightCycler FastStart DNA Master^{PLUS} HybProbe (Roche, Basel, Switzerland) et un thermocycleur CFX96 (BioRad, Hercules, Californie, Etats-Unis) (Annexe X). Les quantités initiales en cDNA pour chaque gène cible sont calculées à l'aide d'une gamme étalon constituée à partir d'un pool de cDNA issu d'échantillons corticaux, médullaires, à J5 et J14 du protocole de suspension. La liste des primers utilisés pour l'amplification se trouvent en Annexe méthodologique 6.6.

7. Dosages ELISA

Dues aux variations basales des niveaux d'hormones au cours de la journée, le sang des souris a été récolté de manière constante entre 9 et 11h du matin au jour final du protocole. Tous les échantillons sanguins sont collectés immédiatement après mise à mort de la souris, puis centrifugés afin de prélever le sérum (Annexe X).

Le dosage sérique de différentes protéines a été effectués via les kits ELISA suivants :

- Kit ELISA testostérone souris/rat ALPCO #55-TESMS-E01 (Alpco, Etats-Unis).
- Kit ELISA corticostérone #AC-14F1 (ids, Angleterre).
- Kit ELISA CTX-I RatLaps #AC-06F1 (ids, Angleterre).
- Kit Quantikine ELISA Mouse/Rat Leptin Immunoassay #MOB00 (R&D Systems, Etats-Unis).
- Kit RayBio® Mouse IGF-1 #ELM-IGF1 (RayBiotech, Etats-Unis).

L'ensemble des protocoles sont détaillés en Annexe 7.

8. Analyses de la densité ostéocytaire et des lacunes vides

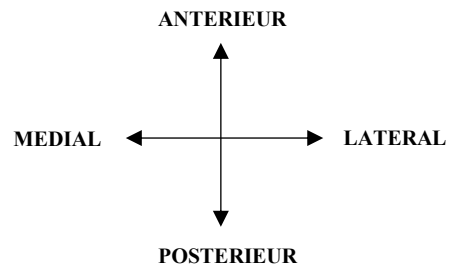
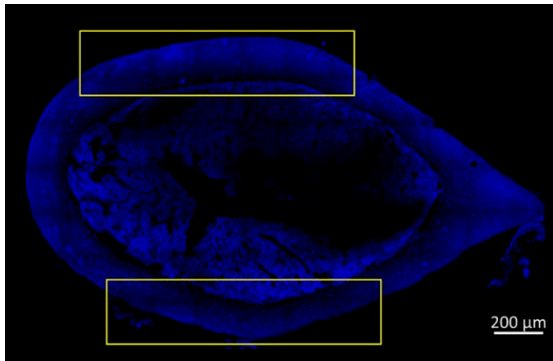
Comme expliqué dans la partie introduction 6.2, la densité ostéocytaire et la proportion de lacunes vides, associées à l'apoptose ostéocytaire dans la littérature, sont évaluées au sein des études HLU sur des sections histologiques de faibles épaisseurs (c.-à-d. 5-8 μ m) pouvant résulter en des faux positifs. De ce fait, la densité ostéocytaire et la proportion de lacunes vides sont analysées en 3D dans cette étude. Pour cela, le tissu osseux nécessite d'être transpa-risé. En effet, une observation microscopique du tissu osseux en profondeur est très limitée par la dispersion et l'absorption de la lumière de celui-ci, le rendant opaque. Cette hétérogénéité optique est due aux différences des indices de réfraction des différents composants tissulaires tels que les lipides, les organites et les structures minéralisées. Des méthodes de « clearing » (c.-à-d. transpa-risation) ont été développées afin de réduire ou supprimer les hétérogénéités optiques des tissus et ainsi réduire la source primaire de la dispersion de la lumière (Jing et al. 2019; Richardson et Lichtman 2015). Le clearing permet d'enlever les composés tissulaires qui bloquent ou dispersent la lumière en utilisant un milieu de clearing qui imprègne le tissu et créer un indice de réfraction uniforme à travers l'ensemble du tissu, le rendant le plus transparent possible. La diminution de la dispersion de la lumière augmente la profondeur de pénétration de la lumière et diminue la perte de signal, permettant à la microscopie claire ou à fluorescence de capturer les détails morphologiques normalement opaques dans un volume tissulaire. Le clearing consiste premièrement à déshydrater le tissu par des solvants organiques afin de solubiliser les lipides et déplacer l'eau hors des tissus, diminuant la différence des indices de réfraction. Des fluides à indice de réfraction supérieur sont ensuite utilisés afin d'uniformiser les indices de réfraction du tissu (Dallas et Moore 2020).

Dans cette étude, des coupes transversales de 400 μ m d'épaisseur sont effectuées au niveau du tiers distal de chaque fémur à l'aide d'une scie diamantée de précision (ESCIL, Chassieu, France). Les fémurs sont préalablement fixés au PFA puis stockés dans du PBS. Ces rings sont ensuite décalcifiés par une incubation de 15h à 4°C dans de l'EDTA (acide éthylènediaminetétraacétique, Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA). Les rings décalcifiés sont incubés sous vacuum dans une solution DAPI 1:100 pendant une heure puis progressivement déshydratés avec une solution éthanol 50%, 75% et 100%. Pour finir, les rings sont transpa-risés avec un mélange d'alcool benzylique et de benzyl benzoate pendant 15 min. Le marquage fluorescent DAPI des noyaux ostéocytaires peut alors être observé sur une profondeur importante de l'échantillon (Annexe méthodologique 8.1).

Une acquisition d'un stack d'image de 100 μ m d'épaisseur du ring avec un intervalle de 2 μ m est effectuée au niveau du cortex postérieur et antérieur du fémur à l'aide d'un microscope confocal laser 800 Airyscan (objectif à immersion x40, Carl Zeiss, Oberkochen, Allemagne) équipé du logiciel Zen (Annexe méthodologique 8.2). Le nombre de lacunes vides et pleines est ensuite compté manuellement dans un volume respectif de 0,008 et 0,004 mm³ pour la ROI antérieure et la ROI postérieure (Fig 12A et 12B). Une lacune contenant un noyau marqué au DAPI est considérée comme pleine et une lacune

sans noyau marqué au DAPI est considérée comme vide. En moyenne, 1115 lacunes sont évaluées par souris (Annexe méthodologique 8.3).

A.



B.

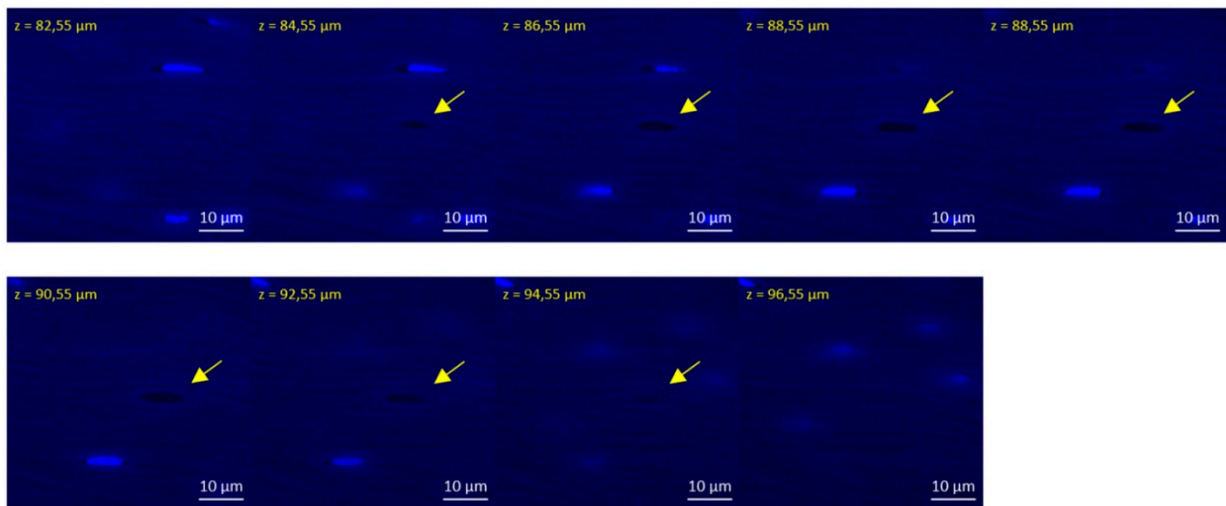


Figure 12 : Zones d'acquisition des images des rings marqués au DAPI (A). Illustration d'une lacune vide (flèche jaune) (B).

9. Analyses du réseau lacuno-canaliculaire et ostéocytaire

L'imagerie des ostéocytes et de leurs dendrites au sein d'un échantillon osseux intact est restée un défi technique pendant de nombreuses années. La plupart des méthodes d'imagerie existantes révèlent seulement le réseau lacuno-canaliculaire. Cependant, l'équipe de Sarah L. Dallas a présenté en 2015 des méthodes reproductibles d'imagerie 2D et 3D des ostéocytes *in situ* via une approche d'imagerie multiplexe dans laquelle les membranes cellulaires, le noyau, le cytosquelette et la matrice extracellulaire peuvent être imagés simultanément (Kamel-ElSayed et al. 2015; Dallas et Moore 2020). Cette méthode inclut notamment l'utilisation d'un fluorophore lipidique, le DIL (1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-tetraméthylindocarbocyanine perchlorate). Ce colorant se diffuse au sein des membranes cellulaires et est relativement insoluble en solution aqueuse. Ce fluorophore est utilisé en neurologie en tant que traceur de neurone : lorsqu'il est utilisé sur un neurone individuel, il se diffuse le long de sa membrane et le transfère aux autres cellules auxquelles il est connecté (Maklad et al. 2010). La fluorescéine quant à elle, est un fluorophore utilisé pour marquer tous les espaces interstitiels du tissu osseux tels que les lacunes et les canalicules (Ciani, Doty, et Fritton 2009; Tiede-Lewis et al. 2017). Dans cette étude, un double marquage DIL-Fluorescéine est effectué afin d'analyser respectivement, le réseau ostéocytaire et le réseau lacuno-canaliculaire (Fig.13).

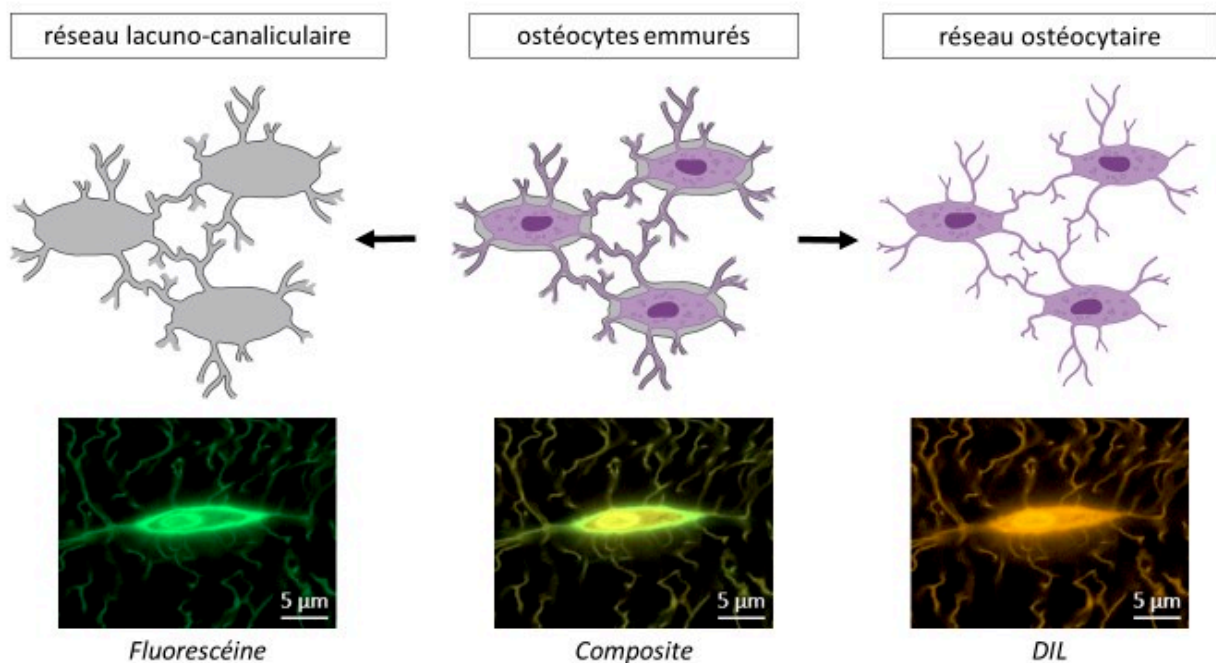


Figure 13 : Illustration du double marquage DIL-Fluorescéine. Illustrations (BioRender.com) et photographies personnelles (objectif à immersion x40, microscopie confocale).

Des rings transversaux du fémur mid-diaphysaire, similaires à ceux effectués pour les analyses DAPI, sont utilisés. De la fluorescéine sodique (#F6377, Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, Etats-Unis) est tout d'abord diluée dans une solution éthanol 100% pour obtenir une concentration de 0,2% en fluorescéine. Séparément, du DIL (#42364, Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, Etats-Unis) est dilué dans du diméthyl sulfoxyde (DMSO) pour obtenir une concentration de 10%. Une solution finale de 0,16%DIL-2%Fluorescéine est obtenue en mélangeant les deux solutions. Les rings transversaux sont incubés 3h sous vacuum dans cette solution DIL-Fluorescéine. L'excédent de colorant est évacué par deux rincages à l'éthanol 100% ; les rings sont ensuite incubés 30min sous vacuum dans un milieu transparisateur composé d'alcool benzylique et d'alcool benzoate (Annexe méthodologique 9.1). L'acquisition des images est effectuée dans la journée.

Une acquisition d'une aire de 30 000 μm^2 est effectuée au niveau du cortex postérieur latéral sur une épaisseur de 50 μm avec un intervalle de 10 μm entre chaque image, à l'aide d'un microscope confocal laser 800 Airyscan pour le marquage DIL et Fluorescéine (objectif à immersion x40, Carl Zeiss, Oberkochen, Allemagne) équipé du logiciel Zen (Annexe méthodologique 9.2) (Fig.14).

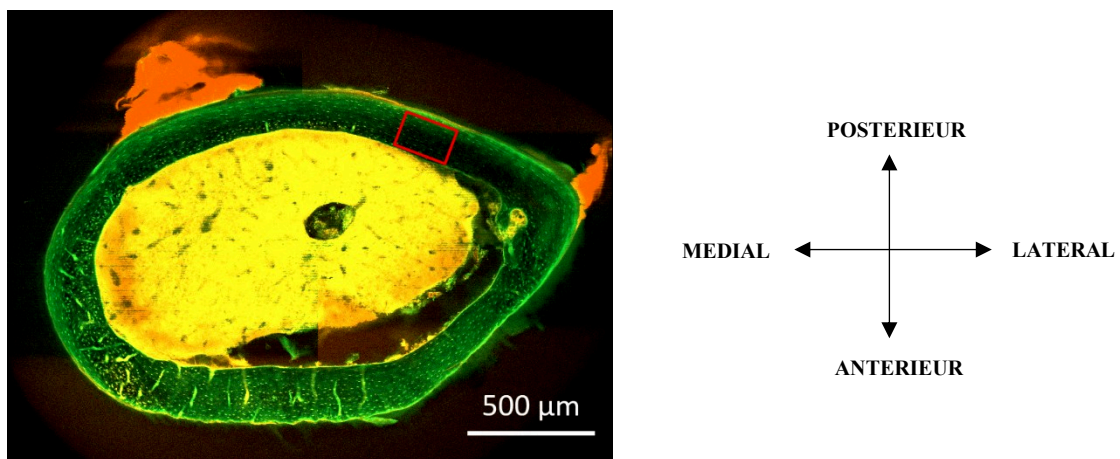


Figure 14 : Photographie d'un ring transversal du fémur mid-diaphysaire marqué au DIL-Fluorescéine. La zone d'acquisition et d'analyse est représentée par le rectangle rouge (Photographie personnelle, objectif à immersion x63, Microscopie confocale).

Analyse des images avec Image J

Une analyse 3D du réseau ostéocyttaire ou lacuno-canaliculaire implique tout d'abord des acquisitions de très longues durées et/ou des acquisitions d'un volume osseux très réduit. De plus, les analyses 3D, notamment la procédure de segmentation des images, nécessitent l'utilisation de serveurs externes et un codage Python afin que les calculs (très lourds) puissent être effectués. Afin de pouvoir analyser un plus grand nombre d'ostéocytes, une analyse 2D de 6 images composant un stack de 50 μm

d'épaisseur est effectuée. Chaque image représente une aire corticale de $30\,000\mu\text{m}^2$. Les images DIL et Fluorescéine sont analysées séparément.

Pour chaque image, une segmentation des lacunes et canalicules pour le marquage fluorescéine, et des corps ostéocytaires et des dendrites pour le marquage DIL, est effectuée via l'outil Image J Trainable Weka Segmentation. Les images segmentées pour les lacunes ou corps ostéocytaires sont ensuite binarisées, puis les particules analysées afin d'obtenir les paramètres suivants (Figure X) :

- aire totale lacunaire (Fluorescéine)/aire totale des corps ostéocytaires (DIL)
- aire moyenne d'une lacune (Fluorescéine)/aire moyenne d'un corps ostéocytaire (DIL).
- nombre de lacunes (Fluorescéine)/nombre de corps ostéocytaires (DIL).

Les images segmentées pour les canalicules/dendrites sont également binarisées puis analysées pour obtenir l'aire du réseau canaliculaire (Fluorescéine) et l'aire du réseau dendritique (DIL) (Figure X). Les images binarisées sont ensuite « squelettonisées » afin de pouvoir effectuer une analyse du squelette (Fig.15). Cette analyse consiste à répartir les pixels du signal présent sur l'image en 3 catégories :

- les « slabs pixels » (orange) : pixels possédant exactement deux pixels voisins.
- les « junction pixels » (violet) : pixels possédant plus de deux pixels voisins.
- les « end-point pixels » (bleu) : pixels possédant moins de deux pixels voisins.

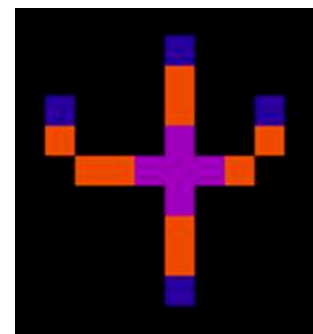


Figure 15 : Illustration de la classification des pixels lors de l'analyse du squelette (Image J).

Cette analyse du squelette permet d'obtenir les paramètres suivants :

- longueur des branches (segments de pixels oranges) = longueur totale des canalicules (Fluorescéine) ou des dendrites (DIL).
- nombre de branches (segments de pixels oranges) = nombres de canalicules (Fluorescéine) ou de dendrites (DIL).
- nombre de jonctions (fusion des pixels violets voisins) = nombre de jonctions canaliculaires (Fluorescéine) ou dendritiques (DIL).

Pour chaque paramètre, une moyenne des 6 images du stack est effectuée. Devant le grand nombre d'images à analyser, la procédure de segmentation ainsi que les différentes analyses ont été entièrement automatisées par la programmation de Macros Image J (Annexe méthodologique 9.4). Les protocoles Image J sont détaillés en Annexe méthodologique 9.3.

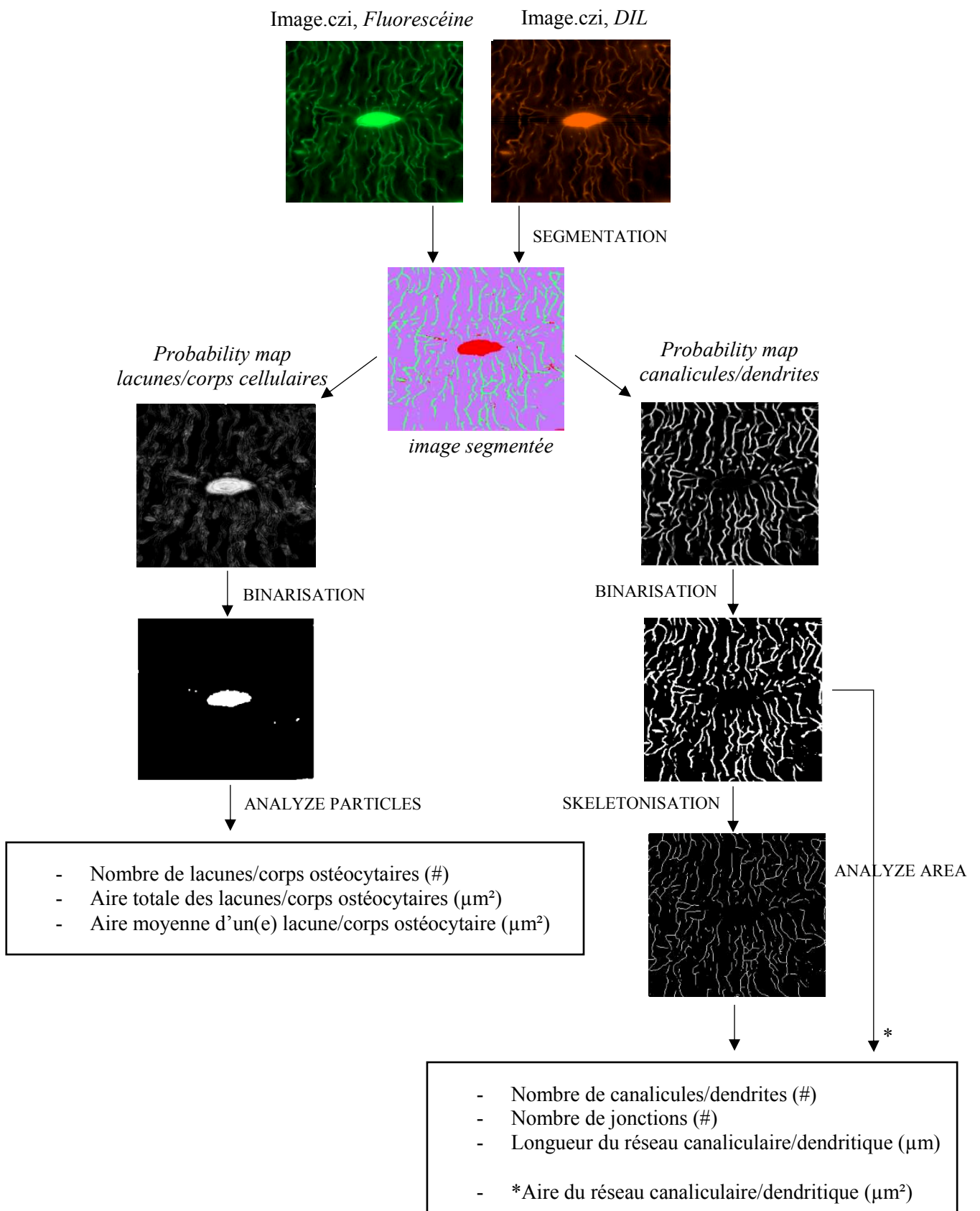


Figure 16 : Illustration des analyses Image J des images DIL-Fluorescéine.

Résultats

Préambule.....	68
Papier 1 – HINDLIMB UNLOADING IN C57BL/6 MICE INDUCES BONE LOSS AT THERMONEUTRALITY WITHOUT ANY CHANGE IN OSTEOCYTE AND LACUNO-CANALICULAR NETWORK	69
Introduction	69
Methods	70
Results	75
Discussion	85
Supplementary data	90
Papier 2 – HINDLIMB UNLOADING-INDUCED BONE LOSS BEARS NO RELATIONSHIP WITH BONE MARROW ADIPOSE TISSUE IN THERMONEUTRAL CONDITION	93
Introduction	93
Methods	95
Results	101
Discussion	108
References	111

Préambule

Les deux premières années de cette thèse ont été effectuées en collaboration avec un autre étudiant en doctorat, Carmelo Mastrandrea, dont le sujet de recherche portait sur le rôle de la BMAT et du vieillissement dans la perte osseuse d'immobilisation. De ce fait, en plus des objectifs annoncés dans l'introduction de ce manuscrit, le rôle de la BMAT a été exploré au sein du modèle HLU, ainsi que la perte osseuse d'immobilisation chez les souris âgées. Nous avons tout d'abord débuté par effectuer des protocoles de suspension à 28°C de 5 et 14 jours chez des souris mâles C57BL/6J. Lorsque nous avons effectué les analyses de l'expression génique des marqueurs ostéocytaires, l'absence de signe d'apoptose et d'élévation de RANKL avec la suspension (des résultats en contradiction avec la littérature) nous ont amené à remettre en question nos conditions expérimentales. Plusieurs paramètres dans nos expérimentations différaient en effet des études antérieures : la température d'hébergement de 28°C au lieu d'une température d'hébergement standard de 22°C, un hébergement isolé ainsi qu'un *pair-feeding* pour les souris contrôles. Ces deux dernières conditions n'étant pas systématiquement respectées dans toutes les études (cf Tableau 2, p.46). C'est pourquoi, nous avons voulu étudier l'impact des conditions d'hébergement indépendamment de la température, en effectuant un groupe de souris contrôles « standard » dans lequel les souris sont hébergées 2 à 2 avec un accès *ad libitum* à la nourriture. Par la suite, nous avons décidé de reproduire l'ensemble des analyses effectuées à 28°C, à une température standard d'hébergement de 22°C afin de confirmer l'hypothèse que la température est un facteur cofondant dans les résultats de la perte osseuse induite par suspension. En parallèle, le rôle de la BMAT a été étudié via l'utilisation de souris KO Seipin^{-/-}. Ces souris sont dans l'incapacité de produire du tissu graisseux et n'ont donc pas de BMAT. Un protocole de suspension de 14 jours à 28°C a été effectué chez ces souris afin d'observer l'influence de l'absence de BMAT sur la perte osseuse. Chez les souris WT C57BL/6J, une analyse de la vascularisation médullaire a également été effectuée chez les souris contrôles et suspendues à thermoneutralité via des analyses immunohistochimiques, de cytométrie en flux et RT-qPCR. Suite à l'observation de l'influence de la température d'hébergement sur la physiologie et les paramètres osseux architecturaux et cellulaires des souris, nous avons décidé d'effectuer l'ensemble des analyses ostéocytaires également aux deux températures d'hébergements, et aux deux périodes de suspension (5 et 14 jours), afin de pouvoir observer une possible différence de cinétique sur le comportement ostéocytaire. L'ensemble de ces travaux ont abouti à la préparation de deux articles conjoints. Un premier par Carmelo Mastrandrea, rapporte les effets de la température et de la BMAT dans le modèle HLU (Papier 2). A ce jour, cet article est toujours en cours d'écriture : les résultats concernant la vascularisation et les souris âgées n'y sont pas encore présentés. Le deuxième article, écrit par moi-même, rapporte les effets de la température et de la suspension sur l'os cortical et les ostéocytes. Il constitue l'article de recherche principal de cette thèse (Papier 1).

Papier 1 – HINDLIMB UNLOADING IN C57BL/6 MICE INDUCES BONE LOSS AT THERMONEUTRALITY WITHOUT ANY CHANGE IN OSTEOCYTE AND LACUNO-CANALICULAR NETWORK

Laura PEURIERE*, Carmelo MASTRANDREA*, Arnaud VANDEN-BOSSCHE, Marie-Thérèse LINOSSIER, Mireille PAUL, Marie-Hélène LAFAGE-PROUST, Laurence VICO.

** co-premiers auteurs*

Introduction

It is well known that physical exercise maintains bone mass whereas reduced mechanical constraints, such as sedentariness and immobilization, which lead to bone loss, as a physiological adaptative response of skeleton. Gravity acts as a major mechanic constraint and its reduction results in high unloading induced bone loss in astronauts. Despite intensive loading-exercise training, astronauts still lose significant bone mass and resistance in weight-bearing bone (Vico & al., 2000; Vico & al., 2017). Moreover, bearing-bones parameters do not recover once astronauts return on Earth and skeletal degradation occurs in non-weight bearing sites, eventually predisposing astronauts to an increasing risk of fractures (Vico & al., 2017). Hence it is important to identify cellular and molecular mechanisms by which unloading affects bone and develop countermeasures to prevent or cure the bone loss. However, these mechanisms are still not fully understood.

Hind-Limb Unloading (HLU) is a well-studied rodent model to simulate some physiological aspects of spaceflight (Morey-Holton & al., 1998). Many studies confirm with HLU model that mechanical unloading results in significant trabecular and cortical bone losses within hindlimbs. This bone loss is more described as a consequence of an elevation of osteoclastic resorption than a decrease in osteoblastic formation (Cabahug-Zuckerman & al., 2016; Moriishi & al., 2012; Plotkin & al., 2015; Shahnazari & al., 2012) when skeletally mature mice are considered. Osteocytes are considered as mechanosensors and orchestrators of bone remodelling by regulation of osteoblast and osteoclast activities (Bonewald, 2011). Consequently, several studies investigated role of osteocytes in HLU model, and more specifically in stimulating osteoclastic resorption. However, they provided conflicting results. Evidences of osteocyte apoptosis was demonstrated in majority of HLU studies (Aguirre & al., 2006; Basso & Heersche, 2006; Cabahug-Zuckerman & al., 2016; Metzger & al., 2017; Plotkin & al., 2015; Swift & al., 2014) and one spaceflight study (Gerbaix & al., 2017). However, osteocyte apoptosis has been shown to be the trigger of bone resorption and of subsequent bone loss only in Cabahug-Zuckerman & al. study (2016), whereas Plotkin & al. study (2015) demonstrated no effect of osteocyte apoptosis on HLU-induced bone loss. On the other hand, Blaber & al. did not show sign of apoptosis but sign of osteocyte senescence and osteolysis after spaceflight. Finally, several HLU investigations show that bone loss is triggered by an increase in osteocytic RANKL and sclerostin production (Cabahug-

Zuckerman & al., 2016; Metzger & al., 2017; Moriishi & al., 2012; Spatz & al., 2012; Xiong & al., 2015).

Laboratory mice are routinely housed and tested at a temperature between 20 to 22°C leading to a chronic cold stress which significantly altered total body metabolism, including greater energy expenditure (David & al., 2013; Fischer & al., 2017), switch of energetic metabolism (David & al., 2013), increased heart rate and blood pressure (Swoap & al., 2004) and higher oxygen consumption (Trayhurn, 1979). Iwaniec & al. showed in 2016 that growing C57BL/6J female mice housed at 32°C experienced unchanged or increased bone growth when compared to respective mice at 22°C with 62% loss of cancellous femur. These temperature effects could be all the more important in HLU-model because mice were isolated and hypodynamic, preventing from possibilities to keep their body warmth. Mice thermoneutral temperature was determined between 26 to 32°C (Fischer & al., 2019), however, main HLU-studies were performed at a standard temperature between 20 to 22°C, which could have provided results with major non-mechanical confounding effects of environment temperature.

In this study we evaluate for the first time the effect of 5-day and 14-day HLU in 4 months aged C57BL/6J male mice at non-thermoneutral temperature (22°C) and thermoneutral temperature (28°C). We specifically investigate femur trabecular and cortical bone losses, bone cellular activities and role of osteocyte. Our investigations provide importance of environment temperature in HLU-model and call into question known cellular mechanisms and more particularly role of osteocyte in unloading bone loss.

Methods

Mice

16-week-old male C57BL/6J strain mice were purchased from Charles River Laboratories (Saint-Germain-Nuelles, France). Mice were first acclimatized for 4 weeks to their cage and environment, then sustained Hind-Limb Unloading (HLU) or ambulatory control conditions (CONT) for 5 or 14 days. During both acclimatization and HLU periods, mice were individually housed in specific suspension cages at either thermoneutral temperature (28°C ± 1°C), or at standard temperature (22°C ± 1°C), with a 12-h dark/12-h light cycle. Mice were fed on a standard rodent chow (SAFE Premium Scientific Diet, Augy, France) and *ad libitum* water. Animal body weight and food consumption were recorded every other day during acclimatization period and every day during the HLU period. During the last week of acclimatization, mice were paired according to body weight, and randomly assigned to control or HLU group. During HLU period, control animals were given same food quantity to that eaten by their respective paired HLU mouse with 24 hours delay. Ad libitum food is provided to HLU mice.

At the end of the experimental period, animals were anaesthetised with high dose of isoflurane and euthanized via cervical dislocation or decapitation to collect blood.

When required for histomorphometric analysis, intra-peritoneal injections of tetracycline (25mg/kg in 0,9% normal saline), were given during the HLU period on days 7 and 12 for 14-day groups, and on days 1 and 4 for 5-day groups.

Depending on the experiment temperature and HLU period time, all mice can be identified as belonging to one of the 8 following groups: 5-day mice at 28°C, control (5dCONT28) and HLU (5dHLU28), 14-day mice at 28°C, control (14dCONT28), and HLU (14dHLU28), 5-day mice at 22°C, control (5dCONT22) and HLU (5dHLU22), 14-day mice at 22°C, control (14dCONT22) and HLU (14dHLU22).

All animal experiments and procedures were performed in accordance with the European Community standards for the protection of animals used for scientific purposes, following approval from the local ethical committee (201611231457342-V6, CEEAL-UJM No 98, Saint Etienne).

Hind-Limb Unloading

Hind-Limb unloading was achieved using the tail suspension model as previously described (Farley & al. 2020). Briefly, a thin metal wire is covered with adhesive bandage (Tensoplast, BSN Medical, Le Mans, France) to prevent direct contact between mouse tail and metallic surface. Mouse was slightly anesthetized with isoflurane and its tail attached to the covered wire via three thin strips of same adhesive bandage, letting enough nude skin for thermoregulation. Care were taken to ensure adequate and secure fixation while minimizing risk of ischaemic damage to the tail. Then the proximal end of the wire was fixed to a rail system at the top of the cage via a pivot which allowed to the mouse a 360° rotation and access to the entire cage surface, food and water. The height of HLU system could easily be adjusted to maintain mice in a ~30° head-down tilt. Each individual HLU system was weighted alone to adjust animal body weight value during protocol.

Micro Computed Tomography (μ CT)

In vivo trabecular bone longitudinal analysis - *In vivo* acquisition of the distal 1/3 of the femur was performed on mice under anaesthesia during the final week of acclimatization and the final day of protocol (70 kV, 114 μ A, voxel size 10.5 μ m³, integration time 200 ms, Scanco Medical, Bassersdorf, Switzerland). A region of interest of 630 μ m thickness from the distal metaphysis, excluding any evidence of growth plate, was analysed to obtain the following trabecular parameters: Bone Trabecular Volume (BV/TV, %), Trabecular Thickness (Tb.Th, μ m), Trabecular Spacing (Tb.Sp, μ m), Trabecular number (Tb.N, 1/mm) and trabecular Connectivity Density (Conn.D, 1/mm³).

Ex vivo cortical bone analysis – To prevent over-irradiation of the mice, μ CT cortical acquisitions were performed on *ex vivo* femur. After mice were sacrificed, femur was collected, cleaned,

and placed into 20% ethanol solution. Total length of femur was scanned using the same parameters than for *in vivo* μ CT), then three specific regions of interest of 630 μ m thickness each: 25%, 50% and 75% of total bone length (Fig.X) were analysed. Cortical bone parameters were obtained by the contouring of inner and outer boundary of cortical section: Cortical Area (Ct.Ar, mm²), Cortical Thickness (Ct.Th, μ m), Medullary Area (Md.Ar, mm²) and Volumetric Bone Mineral Density (vBMD, mgHA/cm³).

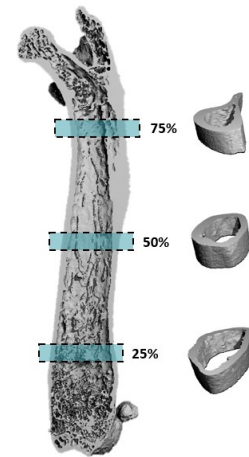


Figure X: regions of interest for cortical bone analysis: 25% (*distal metaphysis*), 50% (*mid-diaphysis*), and 75% (*proximal metaphysis*) of total femur

Histomorphometric analyses

Histomorphometric analyses were performed on non-decalcified femur sections. Using a precision diamond-wire saw (Escil, Chassieu, France), the distal 1/3 of each bone was separated from the proximal 2/3 part. Distal 1/3 pieces were completely dehydrated with sequential increasing concentrations of ethanol then embedded in methylmetacrylate-based medium as previously described (Amblard & al. 2003). 9 μ m thick-sections were obtained using a tungsten-carbide-bladed microtome (Leica SM2500E, Wetzlar, Germany) then stained with Modified Goldner staining or for Tartrate-Resistant Acid Phosphatase (TRAP).

All histomorphometric measures were performed on an area of 1.5mmx1.5mm of the distal femur metaphysis, on 5 non-sequential sections. Bone trabecular volume (BV/TV, %) and Trabecular Thickness (Tb.Th, μ m) measurements were obtained on Modified Goldner stained sections using the automatic image analyser software Bone v.3.50 (Explora Nova, La Rochelle, France) and a microscope Leitz DMRB (Leica, Wetzlar, Germany). TRAP and Tetracycline stained sections were analysed via a developed in-house software coupled to a digitizing table Summasketch III (Summagraphics, Paris, France) and a microscope Axio Scope.A1 (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany). Osteoclast Surface (Oc.S/BS, %) was calculated using TRAP stained sections. Dynamic formation parameters including Mineral Apposition Rate (MAR, μ m/day), Doubled-labelled Surface (dL.S/BS, %) and Bone Formation Rate (BFR/BS, μ m³/ μ m²/day), were calculated on tetracycline-labelled sections.

Gene expression analyses

All animals used for gene expression analyses were not injected with tetracycline to prevent any confounding effects. Following euthanasia, femurs were dissected and diligently cleaned of any muscle fragments. Each bone marrow was separated into their respective cortical compartment via flushing with sterile Phosphate Buffered Solution (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA). Flushed marrow was centrifugated then remaining packed blood cells were resuspended in TRI reagent (Sigma Aldrich, St

Louis, MO, USA) and finally stored at -80°C . Cortical compartment was directly stored in cryotubes at -80°C .

RNA was extracted and purified using an RNeasyPlus Mini Kit (Qiagen Inc, Valencia, CA, USA) and extraction quality assessed with an Experion automated electrophoresis station (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). RNA concentration was quantified via the Quant-iT™ RiboGreen® RNA kit (Life Technologies, Eugene, OR, USA) and complementary DNA (cDNA) was synthesized from 2µg of RNA extract, using an iScript cDNA synthesis kit (Bio rad, Hercules, CA, USA). Cortical bone was crushed before RNA extraction, using steel balls in a Mikro-Dismembrator S mixer mill (Sartorius, Gottingen, Germany).

Real-Time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) was performed on a CFX96 Real-Time Cycler (BioRad, Hercules, CA, USA) using a LightCycler FastStart DNA MasterPLUS HybProbe kit (Roche, Basel, Switzerland).

cDNA starting quantities (SQ) of targeted gene were calculated from a standard range via the CFX Manager software (BioRad, Hercules, CA, USA). All SQ data were normalized with the expression of two reference genes: hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) and beta-glucuronidase (Gus-β).

All targets analysed and conditions used are summarised in Supplementary data 5.

Blood analyses

Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) – blood was collected following euthanasia in 600µL blood collection tubes (BD Microtainer, Franklin Lakes, NJ, USA), then centrifugated at 2000g for 10-minutes. Therefore, serum was collected and stored at -80°C until analyses. All serum samples were collected between 9.00 AM to 11.00 AM. ELISA assays were performed for C-Terminal Telopeptide (CTX) (RatLaps CTX-I EIA kit #AC-06F1, ids, Boldon, UK).

Osteocyte lacunae analyses

400 µm-thick transversal rings from the distal 1/3 of each femur were made with a precision diamond-wire saw (Escil, Chassieu, France). These rings were decalcified for 15-hours at 4°C in ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA), and then incubated under vacuum in DAPI solution 1:100 for 1-hour before being progressively dehydrated with 50%, 75% and 100% ethanol solution. Finally, rings were cleared with a mixed solution of benzylic alcohol and benzyl benzoate for 15-min.

100µm-thick stacks of images were acquired for the anterior and posterior femoral cortices using a confocal laser microscope 800 Airyscan (x63 oil immersion objective, Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) equipped with Zen software. Full and empty lacunae were manually counted for respectively cortex volumes of 0.008 and 0.004 mm³ in anterior and posterior areas. Lacunae with DAPI-stained nucleus inside was appreciated as full lacunae and lacunae without DAPI-stained nucleus inside as empty lacunae. An average of 1115 lacunae was counted and evaluated per animal.

Osteocyte and lacuno-canalicular network analyses

Firstly, fluorescein sodium salt (#F6377, Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA) was dissolved in a 100% ethanol solution to derive 0.2% fluorescein concentration. Subsequently, DIL (1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate; #42364, Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA) was dissolved in DMSO to obtain 10% DIL. A final staining solution of 0.16% and 2% of fluorescein and DIL respectively was attained through mixing both solutions. 400µm-thick transversal rings from the distal 1/3 femur were incubated under vacuum for 3-hours into the staining solution. Rings were rapidly washed out with 100% ethanol solution then incubated for 30-min in similar clearing solution than for DAPI staining.

50µm-thick stack of images with an interval of 10µm were acquired for the lateral posterior femoral cortices using a confocal laser microscope 800 Airyscan (x63 oil immersion objective, Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) equipped with Zen software. Fluorescein and DIL stained images were respectively segmented for lacunae and canaliculi, and osteocyte body cell and dendrites, with Trainable Weka Segmentation Tool on Image J Software. 6 images of 30 000µm² were analysed for each mouse. Results were expressed as mean of these 6 images.

Statistical Analyses

Normality and homoscedasticity of data were confirmed graphically. When data present normal distribution, general linear model (3 Way ANOVA) was performed to test interactions between the 3 following factors: condition (CONT/HLU), temperature (22°C/28°C) and time (5days/14days). Following multiple comparisons with original FDR correction were performed to obtain statistical differences between groups. When data do not present normal distribution, a Kruskal-Wallis multiple comparisons tests with original FDR correction were performed. Data are shown as median and interquartile range. Statistical differences between group are shown as following: Effect of unloading: * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001, ****p<0.0001, compared to respective CONT group. Effect of temperature: t p<0.05, tt p<0.01, ttt p<0.001, tttt p<0.0001, compared to respective 22°C group. Effect of day: d p<0.05, dd p<0.01, ddd p<0.001, dddd p<0.0001, compared to respective 5days group.

Results

The effect of temperature is visible in CONT groups (Fig. 1A). Indeed, both 5d and 14d CONT28 mice present a greater femur distal metaphysis BV/TV than in CONT22 mice (5dCONT22 -22.5% vs 5dCONT28 -15% and 14dCONT22 -25.6% vs 14dCONT28 -8.7%, $p=0.0007$). HLU induces a decrease in BV/TV as early as 5 days in both temperatures (Fig. 1A). At 14 days, 22°C and 28°C HLU mice have reached the same level of bone loss around -35%; noteworthy this level has already reached a plateau at 5 days for 22°C HLU mice (5dHLU22 -39.4% vs 5dHLU28 -24.5%, $p=0.0092$), indicating a quicker bone loss in HLU22°C compared to HLU28°C mice. At both temperatures, BV/TV decrease in HLU is mainly associated to Tb.Th decrease with no change in Tb.N (Supp. data 1). No interaction between unloading, temperature or time was found.

HLU-induced bone loss is associated with an increased resorption activity on trabecular surfaces at both temperatures (Fig. 1B). Osteoclastic surface of HLU mice are higher at 5 days than at 14 days at both temperatures (5dHLU22 10.5% vs 14dHLU22 8.0%, $p<0.0001$ and 5dHLU28 7.0% vs 14dHLU28 3.9%, $p=0.0001$). At 22°C, CONT and HLU mice present higher resorption activity than at 28°C (5dCONT22 +52.6%, 5dHLU22 +50.2%, 14dCONT22 +186.4%, 14dHLU22 +103.7%, compared to respective 28°C group counterpart). However, no interaction effect was found between unloading, temperature and time.

In accordance with trabecular osteoclastic surface results, CTX-I serum level is higher in HLU mice as compared to respective CONT at 5 days and at both temperature (Fig. 1C). However, no more difference is seen between CONT and HLU at 14 days whatever the temperature. CTX-I serum level is higher at 28°C than at 22°C at 5 days in both CONT and HLU while no temperature difference is seen in 14 days groups. These results showed that local and systemic analyses of bone resorption markers did not fully matched. Time has a significant interaction effect with temperature ($p=0.0287$) and unloading ($p=0.0001$).

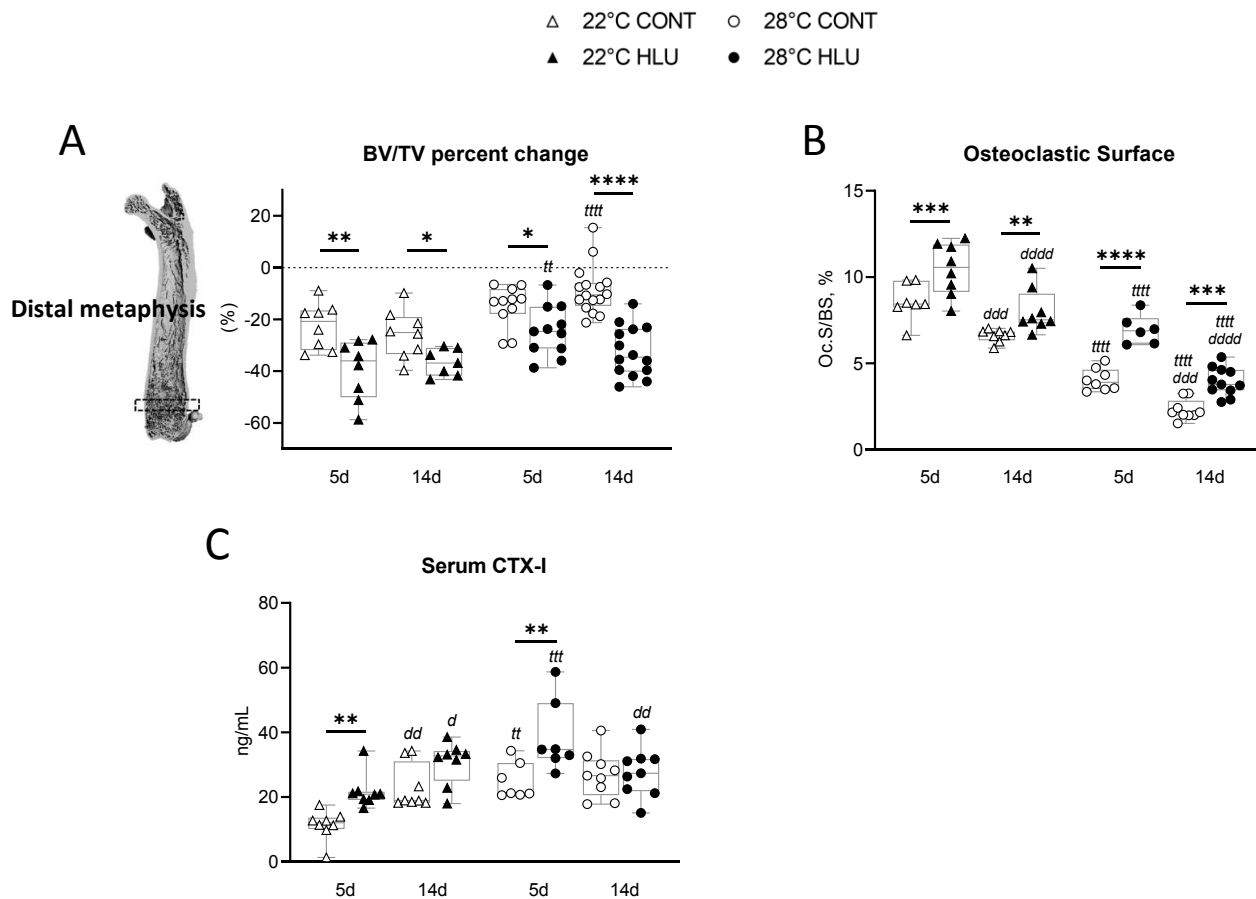


Fig 1 Non-thermoneutral temperature decreases bone volume and increases osteoclastic resorption in CONT (empty symbols) and HLU (black symbols) mice. Triangles are for experiments performed at 22°C, circles for experiments performed at 28°C. 5d = 5days, 14d = 14days. **A** Bone Volume/Total Volume (BV/TV) percent change –pre to –post HLU in femoral distal metaphysis, μ CT. **B** Osteoclastic Surface/Bone surface in femoral distal trabecular metaphysis, TRAP-staining histomorphometry. **C** CTX-I (Cross-linked Carboxyl-terminal telopeptide of type I collagen) serum level, ELISA. Statistical Testing: General Linear Model (3Way ANOVA) with multiple comparisons and FDR corrections. Effect of unloading: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$, compared to respective CONT group. Effect of temperature: t $p < 0.05$, tt $p < 0.01$, ttt $p < 0.001$, tttt $p < 0.0001$, compared to respective 22°C group. Effect of day: d $p < 0.05$, dd $p < 0.01$, ddd $p < 0.001$, dddd $p < 0.0001$, compared to respective 5days group. Data are presented as median and interquartile range.

HLU induces a cortical bone loss after 14 days at both temperatures but effect of unloading and temperature differ depending of analysed bone site. In the cortex of the distal metaphysis (Fig.2A), cortical bone loss is significantly decreased in 14dHLU (vs 14dCONT28, $p = 0.047$) at 28°C only. Nevertheless 22°C and 28°C 14dHLU mice present a similar cortical thinning of -6% and -9% respectively, resulting in similar Ct.Th values: 123 μ m for 14dHLU22 and 124 μ m for 14dHLU28. In the mid-diaphysis (Fig.2B), no HLU effect was observed but 28°C CONT and HLU mice present significant higher Ct.Th than 22°C CONT and HLU mice respectively, at 14 days (14dCONT22 -9.7%, 14dHLU22 -9.6%, compared to respective 28°C mice). In the femoral proximal metaphysis (Fig.2C), 14dHLU22 mice present a decrease in Ct.Th of -7.2% compared to 14dCONT22 mice, close to significance ($p = 0.051$); whereas Ct.Th does not decreased significantly with HLU at 28°C. Only Time x Unloading

interaction effect was found for Ct.Th in proximal metaphysis ($p=0.036$) and Time x Temperature interaction ($p=0.007$) in mid-diaphysis. Cortical Area (Ct.Ar) shows similar variations than Ct.Th but with less significance. Medullary area (Md.Ar) did not change with HLU at both temperature (Supp. data 2).

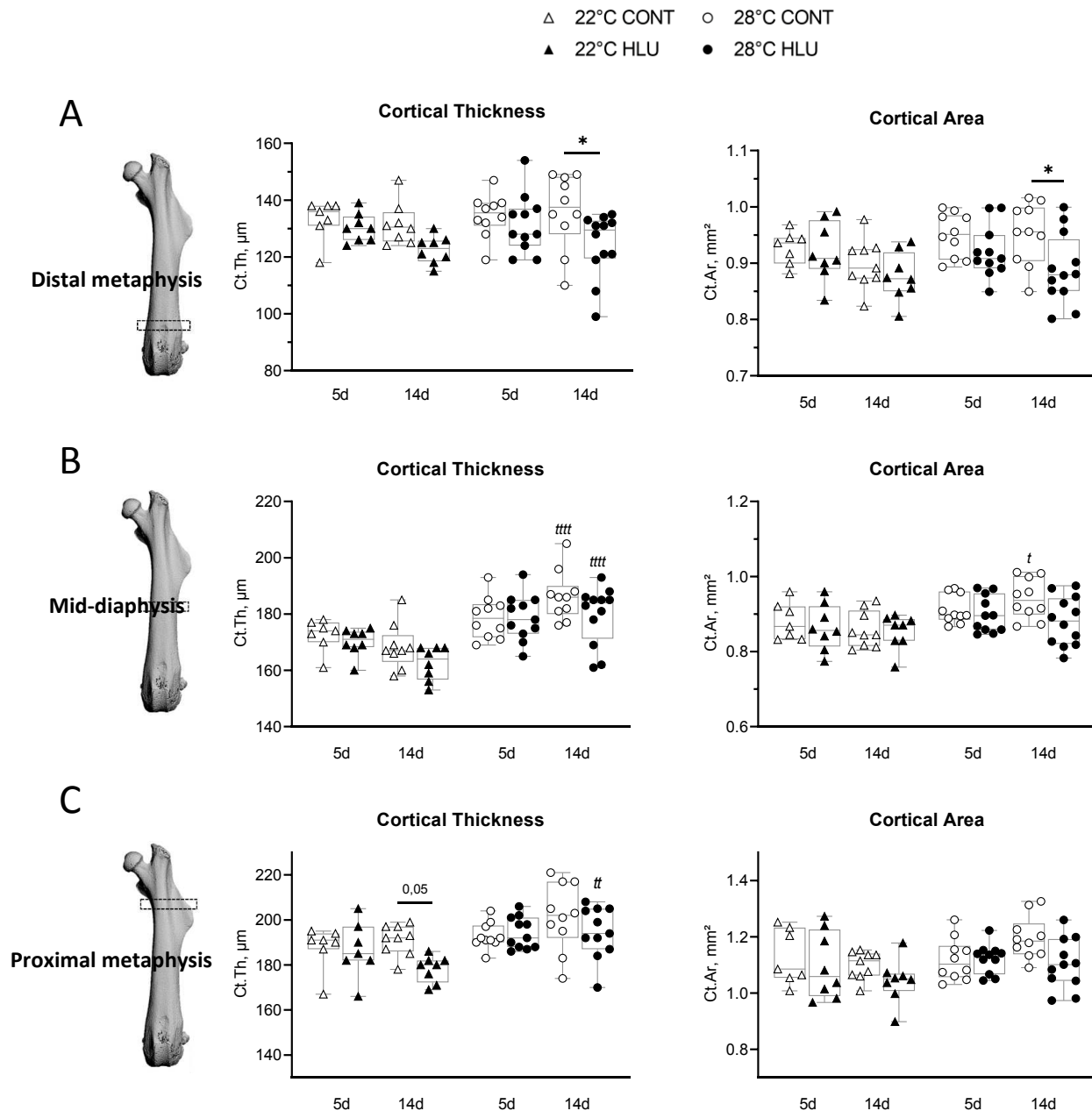


Fig 2 Non-thermoneutral temperature decreases cortical thickness in CONT (empty symbols) and HLU (black symbols) mice. Triangles are for experiments performed at 22°C, circles for experiments performed at 28°C. 5d = 5days, 14d = 14days. Cortical thickness (Ct.Th) and area (Ct.Ar) in distal metaphysis **A**, mid-diaphysis **B**, proximal metaphysis **C**, μ CT. Statistical Testing: General Linear Model (3Way ANOVA) with multiple comparisons and FDR corrections. Effect of unloading: * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, **** $p<0.0001$, compared to respective CONT group. Effect of temperature: t $p<0.05$, tt $p<0.01$, ttt $p<0.001$, tttt $p<0.0001$, compared to respective 22°C group. Effect of day: d $p<0.05$, dd $p<0.01$, ddd $p<0.001$, dddd $p<0.0001$, compared to respective 5days group. Data are presented as median and interquartile range.

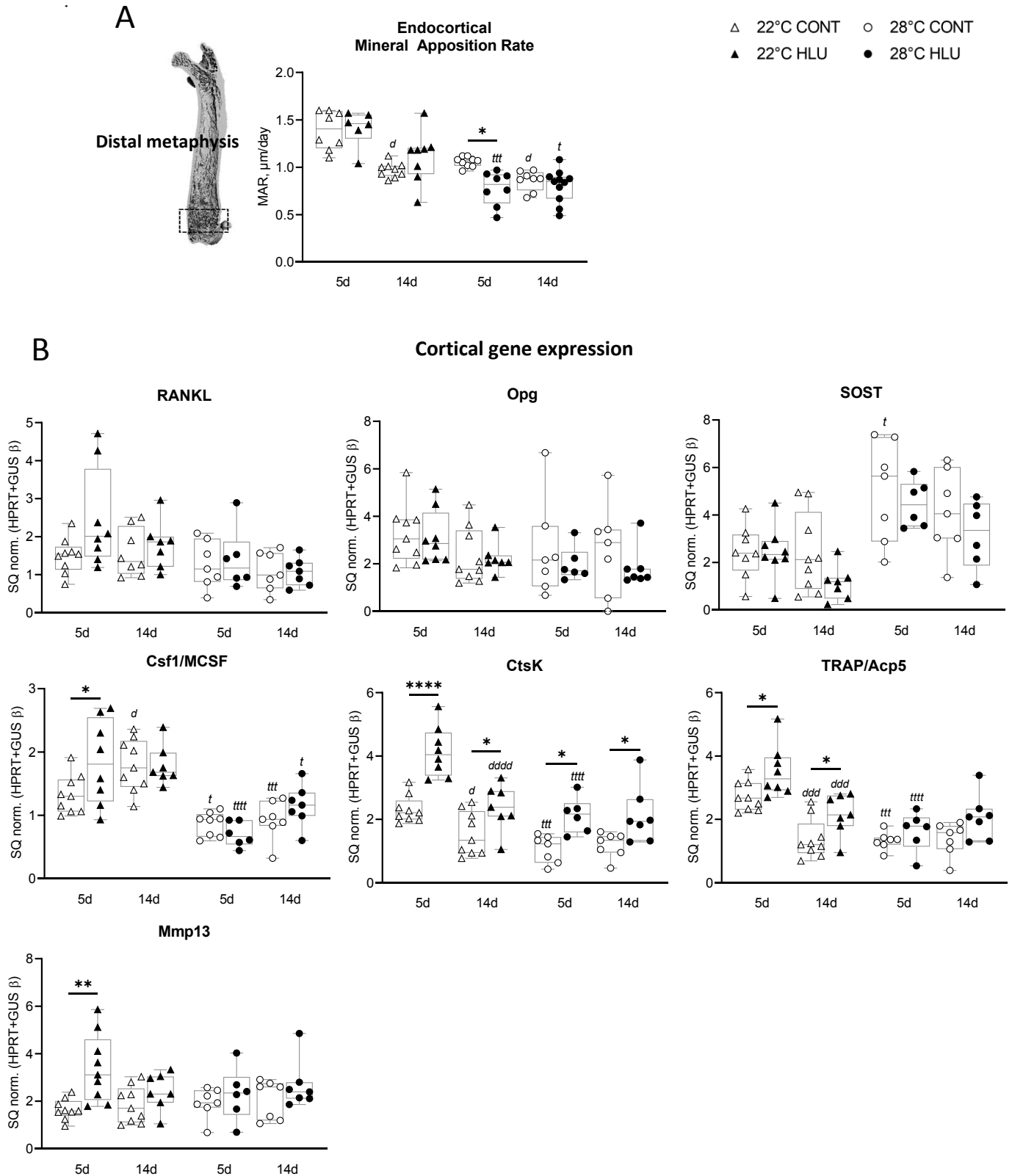


Fig 3 Non-thermoneutral temperature increases resorption and formation activity in CONT (empty symbols) and HLU (black symbols) mice. Triangles are for experiments performed at 22°C, circles for experiments performed at 28°C. 5d = 5days, 14d = 14days. **A** Endocortical Mineral Apposition Rate (MAR) in femoral distal metaphysis, tetracycline-labeling histomorphometry. **B** Cortical gene expression in total femur cortex, RT-qPCR. Gene expression levels were normalized with two reference genes HPRT and Gus β . Statistical Testing: General Linear Model (3Way ANOVA) with multiple comparisons or Kruskal-Wallis multiple comparisons and FDR corrections. Effect of unloading: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$, compared to respective CONT group. Effect of temperature: t $p < 0.05$, tt $p < 0.01$, ttt $p < 0.001$, tttt $p < 0.0001$, compared to respective 22°C group. Effect of day: d $p < 0.05$, dd $p < 0.01$, ddd $p < 0.001$, dddd $p < 0.0001$, compared to respective 5days group. Data are presented as median and interquartile range.

HLU did not affect the endocortical mineral apposition rate (MAR) at the distal level in any group but 28°C mice at 5 days. However, HLU 22°C mice present significantly higher MAR compared to respective 28°C mice at 5 days and 14 days (Fig.3A). CONT 22°C mice present same trends but with no statistical significance. HLU-induced cortical bone loss is associated with increased *Ctsk* expression at both temperature (Fig.3B). At 5 days, 22°C CONT and HLU mice shows a double *Ctsk* expression of the respective 28°C mice (5dCONT22 2.3 vs 5dCONT28 1.1, 5dHLU22 4.1 vs 5dHLU28 2.1). Same variations were observed for the *Trap* cortical expression but with no significant HLU effect in 28°C mice at 5day or 14day (Fig.3B). Only Time x Temperature interaction effect was found for both *Ctsk* and *Trap* gene expression ($p=0.0002$ and $p<0.0001$, respectively). *Rankl* expression increases in HLU at 5 days and 22°C (+77% vs CONT) but not at 28°C at any time of HLU. Bone marrow *Rankl* expression is consistent among temperature, time and unloading groups (Supp. data 3). *Opg* expression does not vary among groups in the cortical compartment and is weakly expressed in the bone marrow (Supp. data 3). No HLU effect is detected on *Sost* cortical expression at both temperatures. However, 28°C mice present higher SOST levels than 22°C mice, the difference being significant at 5 days ($p=0.01$). This last observation is in accordance with the lower Mineral Apposition Rate in 28°C than 22°C mice, independently of unloading. *Mmp13* expression profile is similar than the *Rankl* profile with drastic HLU-induced increase in 22°C HLU mice at 5 days (5dCONT22 1.7 vs 5dHLU22 3.4, $p=0.002$) and no change among the other groups. *Mcsf*, a transcription factor supporting osteoclastogenesis and osteoclast activity, reveals no difference with HLU at both temperature and time. However, both CONT and HLU mice at 22°C has significant higher levels than respective 28°C mice for both time points (5dCONT22: +54%, 5dHLU22: +163%, 14dCONT22: +94%, 14dHLU22: +55%, compared to respective 28°C group), in accordance with increased *Ctsk* and *Trap* expression at 22°C (Fig.3B). No interaction effect was found among variables.

These results suggest that the cortical bone loss is triggered by resorption activity with no change in formation activity at 22°C and 28°C, like in the trabecular compartment. Further, the resorption and formation activities are greater at 22°C than at 28°C.

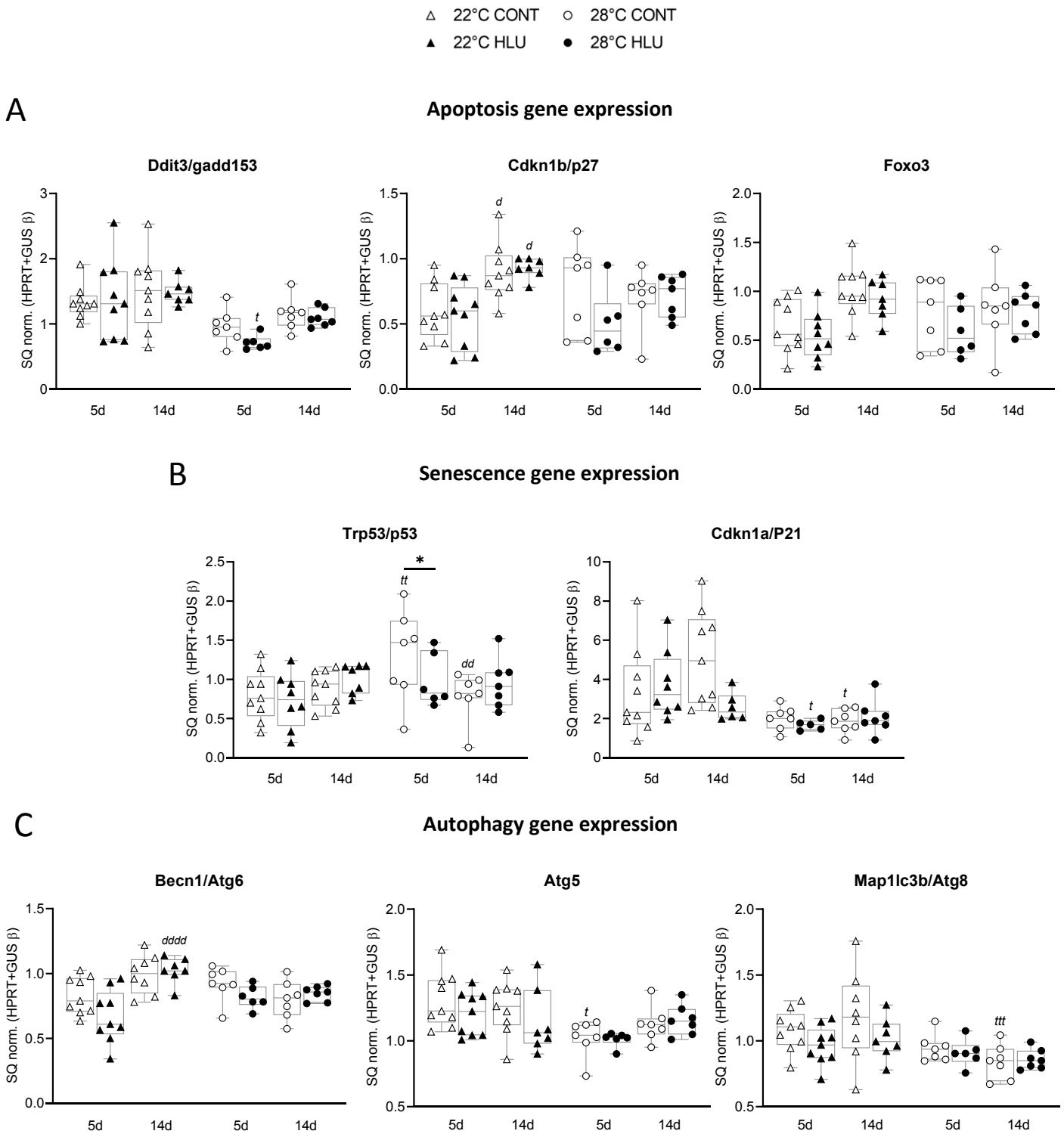


Fig 4 Thermoneutral HLU is not associated with RANKL increasing and non-thermoneutral temperature trends to increase apoptosis, senescence and autophagy markers. CONT (empty symbols), HLU (black symbols) mice. Triangles are for experiments performed at 22°C, circles for experiments performed at 28°C. 5d = 5days, 14d = 14days. Gene expression in total femur cortex for apoptosis markers **A, senescence markers **B** and autophagy markers **C**, RT-qPCR. Gene expression levels were normalized with two reference genes HPRT and Gusβ. Statistical Testing: General Linear Model (3Way ANOVA) with multiple comparisons or Kruskal-Wallis multiple comparisons and FDR corrections. Effect of unloading: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$, compared to respective CONT group. Effect of temperature: t $p < 0.05$, tt $p < 0.01$, ttt $p < 0.001$, tttt $p < 0.0001$, compared to respective 22°C group. Effect of day: d $p < 0.05$, dd $p < 0.01$, ddd $p < 0.001$, dddd $p < 0.0001$, compared to respective 5days group. Data are presented as median and interquartile range.**

We examined the change in gene expression of apoptosis (*Ddit3*, *Cdkn1b*, *Foxo3*), senescence (*Cdkn1a*, *Trp53*) and autophagy (*Becn1*, *Atg5*, *Map1lc3b*). None of them is altered by HLU in both temperatures (Fig.4A,B,C). However, there was a global trend towards higher expression of these genes in 22°C mice compared to 28°C mice independently of loading condition. For *Ddit3* gene, expression was upregulated in 22°C mice about +62% at 5day and +32% at 14 days, compared to 28°C mice. *Cdkn1* do not vary between temperatures at 5days but at 14day, 22°C mice show an increase of 29% compared to 28°C mice. Global trend toward higher expression level in *Ddit3*, *Cdkn1b* and *Foxo3* at 14day than at 5day was also observed in both temperatures, independently of unloading condition. Surprisingly, *Trp53* and *Cdkn1a* present different trends with higher expression level of *Trp53* at 28°C, and of *Cdkn1b* at 22°C, compared to respective temperature group. Moreover, HLU downregulated *Trp53* in 5d 28°C mice and *Cdkn1a* in 14d 22°C. Concerning autophagic markers, 14d 22°C mice present 23% higher expression of *Becn1* than 14d 28°C mice with no difference at 5day. *Atg5* is upregulated of 24% in 5d 22°C mice compared to 5d 28°C mice. Finally, *Map1lc3b* is upregulated of 30% in 14d 22°C mice compared to 14d 28°C mice.

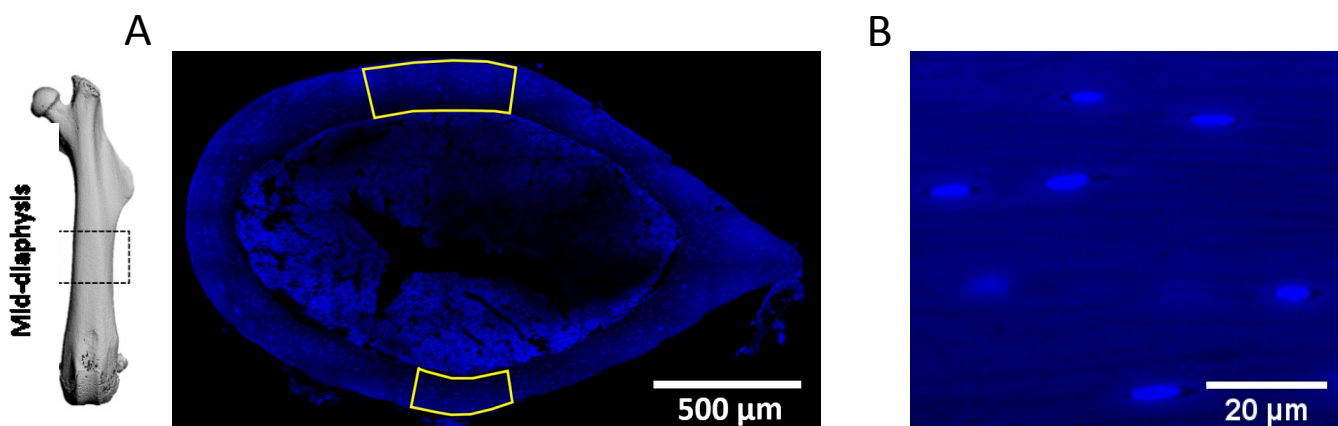


Fig 5 Cleared and DAPI-stained femoral mid-diaphysis cortex for analysis of osteocyte density and proportion of empty lacunae. **A** Femoral mid-diaphysis cortex ring cleared and stained with DAPI, confocal microscopy, x20 objective. Posterior and anterior cortex images were analysed on a depth of 100µm and on an area of 40 000 and 80 000 µm² respectively (yellow squares). **B** DAPI-stained nuclei of osteocytes inside lacunae, confocal microscopy, x63 oil immersion objective.

To test for possible changes in the osteocyte lacuno-canalicular network, we performed 3D analyses in cleared and DAPI-stained femoral mid-diaphysis cortex 400µm thick rings (Fig.5). Surprisingly, osteocyte density and proportion of empty lacunae in anterior or posterior cortex, do not display any change with neither HLU nor temperature (Table 1). Moreover, osteocyte density is similar at 5days or 14days in 22°C (5d: 86 231 Os/mm³ vs 14d: 89 962 Os/mm³) and 28°C HLU mice (5d: 91 542 Os/mm³ vs 14d: 96 994 Os/mm³). Posterior cortex tends to present higher osteocyte density compared to anterior cortex, but with no statistical difference. Osteocyte density in CONT mice is also consistent among groups and ROIs. In addition to absence of increase in empty lacunae number,

proportion of empty lacunae does not exceed 0.5% in any groups (Table 1). These results are thus in line with our gene expression analysis on cell death, senescence or autophagy, which do not increase with HLU (Fig.4A,B,C). Even if 22°C mice present global trend towards higher expression of cell death markers, these expression levels are insufficient to induce an osteocyte death at 14days in HLU mice. As osteocyte density, proportion of empty lacunae is similar through the time and ROIs.

Table 1 Osteocyte density and proportion of empty lacunae do not change with neither HLU nor non-thermoneutral temperature. DAPI-staining 3D analysis of 0.004mm³ (posterior ROI) and 0.008mm³ (anterior ROI) in mid-diaphysis femoral cortex. Statistical Testing : Kruskal-Wallis multiple comparisons with FDR correction. Any statistical significant change was found. For all groups: n=7. 5d = 5days, 14d = 14days.

	22°C				28°C			
	5d		14d		5d		14d	
	CONT	HLU	CONT	HLU	CONT	HLU	CONT	HLU
ANTERIOR ROI								
Osteocyte density (1/mm ³)	89 630 [82 630-90 496]	86 231 [84 430-94 358]	93 794 [81 483-99 598]	89 962 [87 573-93 863]	90 348 [84 467-97 811]	91 542 [87 816-99 158]	89 312 [83 450-95 652]	96 994 [89 427-98 044]
Empty lacunae (%)	0.27 [0.00-0.71]	0.27 [0.15-0.37]	0.00 [0.00-0.26]	0.28 [0.14-0.43]	0.44 [0.00-0.88]	0.47 [0.15-1.42]	0.34 [0.15-0.81]	0.28 [0.25-0.39]
POSTERIOR ROI								
Osteocyte density (1/mm ³)	97 480 [91 986-103 465]	104 782 [83 217-114 765]	94 966 [88 393-102 722]	99 823 [97 363-110 942]	95 669 [86 715-103 439]	90 477 [83 972-99 249]	100 842 [94 599-107 211]	98 206 [86 173-114 655]
Empty lacunae (%)	0.00 [0.00-0.22]	0.20 [0.00-0.30]	0.24 [0.00-0.29]	0.00 [0.00-0.44]	0.29 [0.24-0.52]	0.00 [0.00-0.30]	0.25 [0.00-0.41]	0.00 [0.00-0.26]

Structures of osteocyte and lacuno-canalicular (LCN) network were assessed with cleared and DIL-Fluorescein stained femoral mid-diaphysis cortex (Fig.6A). Lacunae, canaliculi, osteocyte cell body and dendrites were analysed separately after segmentation of images on Image J. At 5days, structure of osteocyte or LCN network is similar between CONT and HLU mice in both temperatures and no significant effect of temperature was observed (Table 2).

At 14 days, whereas 28°C mice do not present variations of canalicular parameters between CONT and HLU group, 22°C HLU mice present a drastic reduction of these parameters compared to 22°C CONT mice (Fig.6B, Table 2). At 22°C, canalicular area is decreased with HLU compared to 22°C CONT, 3566µm² vs 4372µm² (-28%) respectively (*p<0.05), and compared to 28°C HLU, 4696µm² vs 3566µm² (-32%) respectively (tt p<0.01). 14D HLU 22°C mice present high variation in canalicular area data (min: 1192µm², max: 4511) compared to 14D 28°C HLU mice (min: 3973µm², max: 5700µm²). Although some mice of 14D HLU 22°C group present similar canalicular area than their respective CONT, first and third quartile of 22°C HLU mice are respectively inferior and superior compared to those of 22°C CONT mice for canalicular area, canaliculi number, junction number and canaliculi length (Table 2) compared to those of 22°C CONT mice for canalicular area, canaliculi number, junction number and canaliculi length (Table 2).

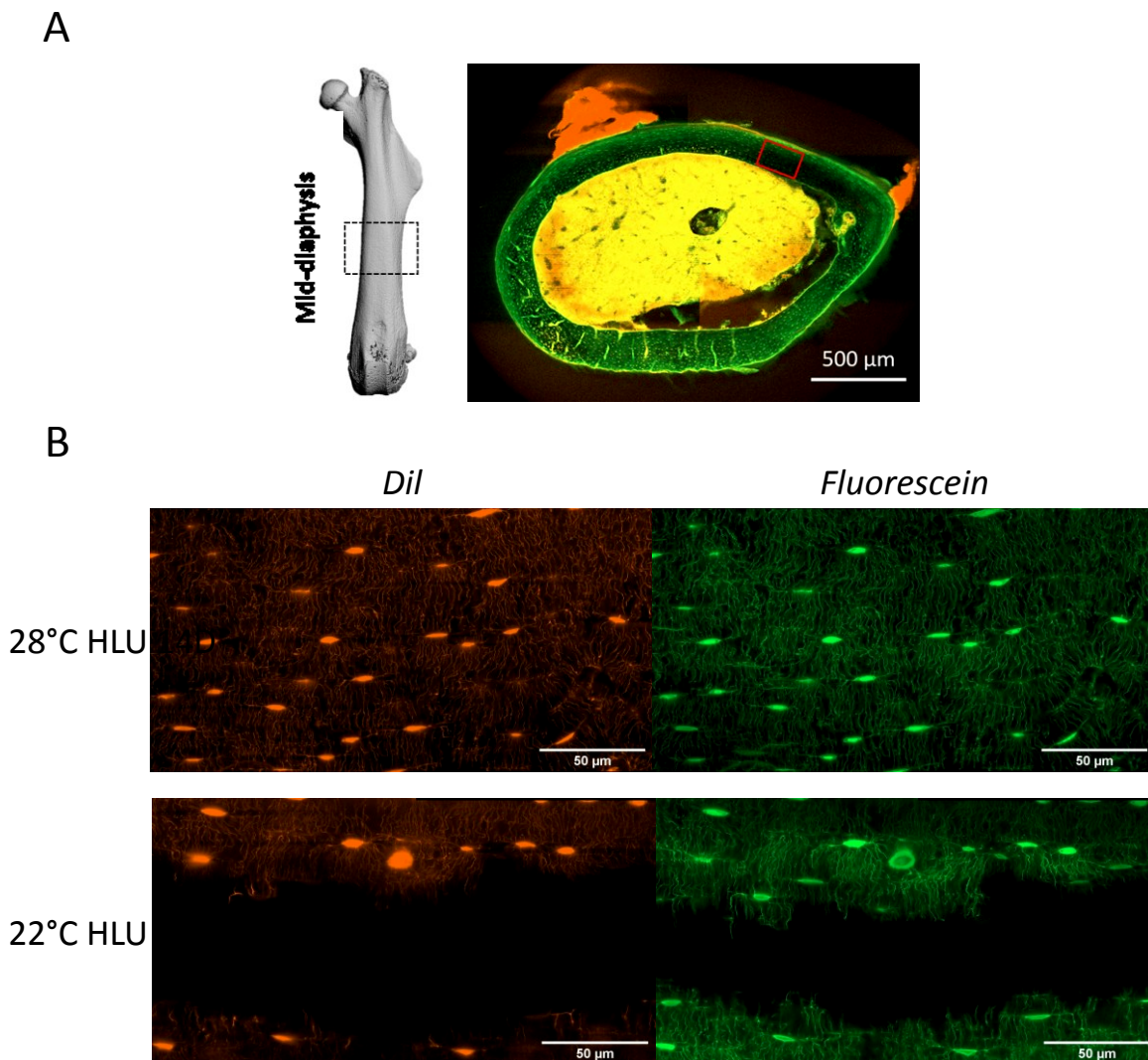


Fig 6 Confocal microscopy imaging of osteocyte network (DIL labeling) and lacuno-canalicular network (Fluorescein labeling) for structural analysis. **A** Femoral mid-diaphysis cortex ring cleared and stained with DIL-Fluorescein, confocal microscopy, x63 oil immersion objective. Acquisition and analysed ROI is shown as red square and corresponding to an area of 29 440 μm^2 in lateral posterior cortex. **B** Osteocyte network (DIL) and lacuno-canalicular network (Fluorescein) of analyzed area in 28°C HLU 14D and 22°C HLU 14D mice. 22°C HLU mice show black area among cortex where DIL or Fluorescein staining were not perfused.

At 14 days, osteocyte network (DIL) present same variations among groups in structural parameters than LCN parameters, but with no statistical significance due to higher variation than for LCN network. 22°C HLU mice present a reduction of -22% compared to 22°C CONT mice, and of -43% compared to 28°C HLU mice. Like LCN network parameters, some mice of 14D HLU 22°C group present similar dendrites area but first quartile of this group is systematically very inferior to those of 22°C CONT mice for dendrites area, dendrites number, junction number and dendrites length (Table 2).

As shown in Fig 6B, reduction of dendrite and canaliculi area in 14D HLU 22°C mice is manifested by large gaps in DIL or Fluorescein staining. However, DAPI-staining analysis shown no variation in

osteocyte density or proportion of empty lacunae with HLU or temperature (Table 1). Hence, these gaps contain lacunae and osteocytes, but which are not perfused with DIL or Fluorescein staining. Moreover, if number or length of dendrite/canaliculi is normalized per osteocyte, values are constant among groups, even in 22°C HLU group (Supp. data 4).

These results suggest no structural change in osteocyte or LCN network, but an altered communication in osteocyte and canalicular network. Interestingly, single lacunae or osteocyte cell body area were not increased or decreased with 5 or 14days HLU in both temperatures (Table 2), suggesting an alteration concentrated at level of dendrites and canaliculi without change in lacunae. Moreover, increased expression of genes implicated in peri-lacuno-canalicular remodeling, *Ctsk*, *Trap* and *Mmp13*, were increased in HLU 22°C mice (Fig.3).

Table 2 HLU induces an altered canalicular network with non-thermoneutral temperature. Image analysis of segmented DIL and Fluorescein labeling in an area of 29440 μm^2 , Image J. Statistical Testing : General Linear Model (3Way ANOVA) with multiple comparisons or Kruskal-Wallis multiple-comparisons and FDR corrections . Effect of unloading : * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, **** $p<0.0001$, compared to respective CONT group. Effect of temperature : t $p<0.05$, tt $p<0.01$, ttt $p<0.001$, tttt $p<0.0001$, compared to respective 22°C group. Effect of day : d $p<0.05$, dd $p<0.01$, ddd $p<0.001$, dddd $p<0.0001$, compared to respective 5days group. Data are presented as median and interquartile range. 22°C 5D: n=6-8, 22°C 14D: n=8-11, 28°C 5D: n=6-7, 28°C 14D: n=6-7. 5d = 5days, 14d = 14days.

	22°C				28°C			
	5d		14d		5d		14d	
	CONT	HLU	CONT	HLU	CONT	HLU	CONT	HLU
Lacuno-canalicular network								
Single lacunae area (μm^2)	24,93 [24,53-25,10]	25,06 [23,24-25,65]	22,82 [21,25-24,57]	22,70 [20,72-25,50]	21,33 [19,25-23,60]	21,26 [19,87-24,92]	24,88 [24,01-26,61]	25,80 [21,43-27,35]
Canicular area (μm^2)	4721 [4460-5939]	4577 [4384-5365]	4372 [3864-5092]	3566 * dd [1363-4288]	5287 [4855-5680]	5641 [4542-5954]	4587 [4318-5737]	4694 tt [4143-5509]
Canaliculi number (#)	10502 [7744-11718]	8978 [8622-11603]	9511 [7201-10733]	6326 ** dddd [5050-7852]	10998 [8882-12511]	10062 [8310-11531]	9421 [9191-10489]	9077 tt [8419-9706]
Junction number (#)	3175 [2375-4226]	2971 [2617-3985]	2536 [1960-3160]	1351 * ddd [901-2077]	3607 [2932-4469]	3922 [2164-4213]	2395 [2187-3248]	2267 t [2006-3066]
Canaliculi length (μm)	13710 [11506-16381]	12829 [11947-15524]	13204 [11565-14614]	9524 ** ddd [4285-12198]	15792 [14657-16295]	15726 [14361-16291]	14771 [13759-15734]	14757 tt [12849-15108]
Osteocyte network								
Single body cell area (μm^2)	26,11 [22,16-27,56]	23,65 [23,07-26,43]	21,87 [19,81-27,91]	22,32 [21,87-25,33]	22,54 [19,70-25,68]	22,01 [19,42-24,03]	24,96 [24,24-25,77]	23,96 [20,52-27,23]
Dendrites area (μm^2)	4072 [3862-4274]	4097 [3497-4316]	3725 [3349-3809]	3840 [1224-4073]	3829 [3746-4030]	3906 [3687-4210]	4118 [3714-4365]	4149 [3785-4337]
Dendrites number (#)	9499 [8700-10668]	11404 [8464-12930]	8009 [7399-9092]	8036 [3761-9280]	7269 [6888-7715]	7371 [6951-8141]	8356 [7949-9085]	7231 [7062-7748]
Junction number (#)	2296 [2177-2490]	2458 [1890-3402]	1816 [1733-2019]	1990 [764-2283]	1678 t [1556-1847]	1811 [1600-1988]	1932 [1885-2301]	1751 [1653-1873]
Dendrites length (μm)	12352 [11768-13231]	13045 [10846-14160]	11631 [11202-12228]	12312 [3931-12940]	12319 [11541-12707]	12447 [10679-12994]	12475 [12107-14106]	12928 [11561-13486]

Discussion

The main goal of this experiment was to use HLU to induce a pro-resorptive bone state to further document the osteocyte response during bone resorption. We use C57BL/6 mice with a mature skeleton – to avoid growth-related effects – at two time points to evaluate the early and later responses.

Because it was clearly established that bone parameters are influenced by energy metabolism (Iwaniec & al. 2016; Martin & al. 2019; Chevalier & al. 2020), we compared mice maintained at a standard laboratory temperature (22°C) and at their thermoneutral temperature (28°C). This is of particular importance in this model where the mice are single-housed without the possibility to use a nest and therefore cannot warm up. In a parallel work using the same mice (awaiting publication), we showed that CONT and HLU mice kept at 22°C displayed higher energy expenditure and oxygen consumption as compared to corresponding CONT and HLU kept at 28°C, suggesting higher basal metabolic rate caused by a thermic stress at 22°C. A temperature of 22°C substantially decreases trabecular bone volume of CONT mice compared at 28°C. Moreover, 22°C accelerates HLU-induced bone loss. Indeed, while at both temperatures, HLU induces trabecular bone loss as early as 5 days, the BV/TV loss at 22°C is greater than at 28°C. However, at 14 days, HLU values are similar at both temperatures, suggesting that trabecular bone loss has attained a plateau at around -35% in C57BL/6 adult mice. This bone loss is associated with higher osteoclastic activity (Oc.S/BS) and no change in bone formation activity (MAR, dLS/BS, BFR; awaiting publication) at both temperatures, in accordance with several other HLU studies (Shahnazari & al. 2012; Saxena & al. 2011; Spatz & al. 2013; Halloran & al. 1988; Moriishi & al. 2012). Resorption activity on trabecular surfaces is higher at 5 days than at 14 days, at both temperatures, confirming that its peak is occurring during the first days of unloading (Sakata & al. 1999; Shahnazari & al. 2012). Noteworthy, in all the groups the active osteoclastic surfaces are always greater at 22°C than at 28°C which might explain why trabecular bone volume is lower at 22°C. Besides, in our parallel work (awaiting publication), we showed that the bone marrow adipocytes do not impart a significant effect on unloading-induced bone resorption at thermoneutrality. Because there being much discussion regarding the role of osteocytes in recruitment and activation of osteoclasts (Xiong & al. 2015; Cabahug-Zuckerman & al. 2016), it was thus even more essential to investigate the osteocyte network.

Even though trabecular bone loss was observed as early as 5 days of HLU at both temperatures, a cortical bone loss was only detected after 14 days of HLU. This pattern of cortical loss – occurring after the trabecular bone loss - in hind limbs is well described in several previous HLU studies (Basso & Heersche 2006; Metzger & al. 2017; Peres-Ueno & al. 2017; Plotkin & al. 2015; Simske & al. 1992), while it is detected earlier, at 7 days of HLU, in lumbar vertebra (Aguirre & al. 2006). The analysis of cortical parameters in 3 different ROIs in femur permitted to observe site-specific response to HLU and temperature. In mid-diaphysis, cortical thickness (Ct.Th) of CONT mice significantly smaller at 22°C compared to 28°C. 22°C temperature also decreases cortical thickness of HLU mice in mid-diaphysis

and proximal metaphysis, compared at 28°C. Indeed, contrary to trabecular compartment, 22°C and 28°C HLU mice do not present similar cortical thickness values at 14 days. These observations suggest that cortical bone loss plateau was not attained with 14 days of HLU and could be observed with a longer period of HLU. In this case, as in trabecular compartment, 22°C temperature would accelerate cortical bone loss in HLU mice. HLU induced-cortical bone loss is associated with increased resorption activity with no change in bone formation activity, in both temperatures. Indeed, 22°C HLU mice present elevated expression of *Rankl* at 5 days of HLU, in accordance with several studies (Xiong & al. 2015; Cabahug-Zuckerman & al. 2016; Plotkin & al. 2015; Saxena & al. 2011). However, this elevation in *Rankl* expression was not observed in HLU mice at 28°C. Moreover, 22°C HLU mice present significant elevation of several resorption markers at 5 days (*Ctsk*, *Trap*, *Mmp13*, *Rankl*, *Mcsf*), whereas 28°C HLU mice only present elevation in expression of *Ctsk* at 5 days. These results are in line with histomorphometric analysis in trabecular compartment. 22°C temperature also increases critical markers of resorption activity in CONT mice, with higher expression of *Mcsf*, *Ctsk* and *Trap* compared at 28°C CONT mice. However, 22°C temperature increases also bone formation activity, with higher endocortical MAR and fewer *Sost* expression in CONT and HLU mice, compared to those at 28°C. These results suggest higher bone cellular activities at 22°C, but still in favour of resorption activity compared at 28°C. This study clearly shows that housing temperature influence trabecular and cortical bone parameters and cellular activities, independently of unloading condition.

When cells irreversibly accumulate damages, they can permanently arrest the cell cycle (cellular senescence) or trigger cell death programs as apoptosis (self-killing) or autophagy (self-eating) which could contribute to cell death. Osteocyte apoptosis was found in different type of bone loss, as during microfractures induction (Kennedy & al. 2012; 2014; Cardoso & al. 2009) or estrogen depletion (Emerton & al. 2010), where it was assessed by immunohistochemistry of activated-caspase 3 on thin sections (5-8µm). Signs of osteocyte death were also reported in several HLU studies (Aguirre & al., 2006; Basso & Heersche et al., 2006; Cabahug-Zuckerman & al., 2016; Metzger & al., 2017; Plotkin & al., 2015; Swift & al., 2014) and in one spaceflight study (Gerbaix & al., 2017). Cabahug-Zuckerman & al. (2016) treated mice by a systemic apoptotic inhibitor and, after checking that the treatment did not alter osteoclastogenesis, showed that osteocyte apoptosis is required to trigger bone resorption and subsequent bone loss. While Plotkin & al. (2015) did also observe osteocyte apoptosis, they showed that blockade of osteocyte apoptosis and consequent increased osteocytic RANKL is not sufficient to restrain osteoclast formation, inhibit resorption, or stop bone loss induced by skeletal unloading. On the contrary, after a space mission of 15 days, 16-week-old female C57BL/6J mice displayed bone losses with no evidence of osteocyte apoptosis and no increased expression of the pro-apoptotic gene p53 (Blaber & al. 2013). Again, in all these studies, except for Blaber & al. (2013) who perform gene expression analysis, osteocyte apoptosis was assessed on thin histologic sections (5-8µm) with TUNEL labelling

or caspase-3 activated immunolabeling, or by counting empty lacunae. However, it has been showed that quantifying osteocyte apoptosis from thin histologic section greatly overestimates the number of empty lacunae, due to shrinkage of tissue and osteocytes during processing (Jilka, Noble, & Weinstein 2013). Moreover, some decalcification and histologic processes could lead to false-positive for TUNEL and caspase-3 labelling on osteocytes (Emans, Bulstra, & Kuijer 2005; Stähelin & al. 1998). Previous study from our group indicates that endocortical bone resorption is occurring during HLU at 28°C in C57BL6 mice a little younger than those used in the current study, with osteoclastic activity elevated in the posterior femoral diaphysis (Farley & al., 2020). Further, the Farley & al study found evidence for neither increased numbers of apoptotic osteocytes, nor increased numbers of empty lacunae in HLU mice. In this study it was indeed observed that osteocyte lacunae on thin histological sections often appeared empty while in fact they are filled by DAPI-stained osteocytes in subsequent sections of 100µm-thick stack. Therefore, we used the same technique in the current study at both the posterior and anterior femoral diaphysis – we also were not able to show more empty lacunae in HLU groups, thus confirming the Farley & al. (2020) results.

Lot of evidence suggests that the osteocyte network serves a mechanosensory function for bone and by detecting subtle local changes, trigger signals to osteoblasts or osteoclasts resulting in bone gain or loss where needed. Besides, study of Blaber & al., (2015) after a space mission brought out evidence of senescence but not of apoptosis in osteocytes. Thus, we undertook an in-depth investigation of osteocyte behaviour and of the lacuno-canalicular (LCN) network. Contrary to all existing HLU studies, we did not find any evidence of osteocyte death. First, as already mentioned 3D analysis of DAPI-stained midshaft cortex did not show any change in osteocyte density and empty lacunae with HLU. Second, none of the genetic markers of apoptosis, autophagy or senescence were altered. Importantly, in CONT and HLU groups, osteocyte density and proportion of empty lacunae were also not different at 22°C and 28°C and are very seldom found (<0.5%). Even though 22°C mice present global trend to higher expression of apoptosis, senescence and autophagic markers, these expressions are not sufficient to induce an osteocyte death. These results indicate firstly that the mechanical unloading does not induce osteocyte death, and secondly that osteocyte death is not required to induce increased resorption activity and subsequent cortical bone loss, either at 22°C or at 28°C.

Osteocytes are able to perform a peri-lacuno-canalicular remodeling (PLR) thanks to secretion of different enzymes as Mmp2, Mmp13, Mmp14, Ctsk and Acp5. PLR is useful to maintain bone quality by renewing extra-cellular matrix around lacunae and canaliculi (Tang & al. 2012; Dole & al. 2017; Fowler & al. 2017). Modifications of lacunae or canaliculi caused by altered PLR were found in many cases. With aging, number and volume of lacunae and canaliculi decreased (Heveran & al. 2018; 2019; Hemmatian, Laurent, & al. 2018). Inverse statement was found in cases of metabolic stresses: glucocorticoid treatment, ovariectomy or lactation were associated to an increase of lacunae and

canaliculi volume (Kaya & al. 2017; Hemmatian, Jalali, & al. 2018; Lane & al. 2006; Sharma & al. 2012). These modifications were associated to changes in biomechanical proprieties of bone and alteration of mecanotransduction of osteocyte. In spaceflights, only two studies investigate that lacuno-canalicular (LCN) system. In Gerbaix & al. (2017), synchrotron radiation tomographic analyses revealed that osteocyte lacunae are smaller in post-flight posterior femur mice. On the contrary, Blaber & al. (2013) found increased osteocyte lacunar area and canaliculi diameter in ischial bone with nano-computed tomography analyses. In the immobilisation model induced by botulinum toxin, analysis of lacunae area by synchrotron radiation μ CT provided no change in femur mid-diaphysis (Bach-Gansmo & al. 2016). More recent studies begin to also study osteocyte dendritic network. Lower osteocyte density and dendrite numbers per osteocyte were found in aged mice femur thanks to multiplexed 3D confocal imaging (Tiede-Lewis & al. 2017) and in HLU rat femur with scanning electron microscopy analysis (Zhang & al, 2019).

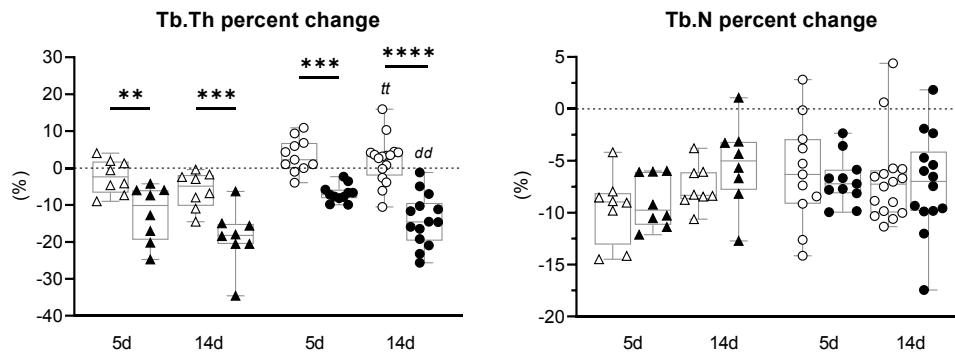
The current work evaluated morphology of both osteocyte network (dendrites and osteocyte cell body) thanks to membrane-DIL staining, and lacuno-canalicular (LCN) network (lacunae and canaliculi) which was permeated with fluorescein dye. At thermoneutral temperature (28°C), no morphologic changes were found with HLU in both osteocyte and LCN network. However, at 22°C, gaps in canalicular network and osteocyte network were observed in unloaded mice. In aged mice, Tiede-Lewis & al. (2015), also found gaps in osteocyte network. However, contrary to this last study and the one of Zhang & al. (2019), we did not find lower osteocyte density or number of dendrites per osteocyte. This suggested that HLU at 22°C only alters connectivity in the dendrites network. However, as Tiede-Lewis al. suggested, a disrupted network can herald an osteocyte death. It is thus possible that this may occur in HLU period longer than 14 days, as Zhang & al. (2019) observed after 5 weeks of HLU on mature rats. In our study, altered connectivity of osteocyte network could result from several and non-exclusive events. First, disruption of dendritic network may arise from local cortical bone remodelling activity, which would disrupt canaliculi, and subsequently altered dendrites connectivity. Second, we could also suppose a degradation of gap-junctions (Cx43) between dendrites which is also known to be associated to increased resorption activity – as observed in our 22°C HLU mice - and altered bone structure and mechanical integrity (Zhang & al. 2011; Davis & al. 2017; 2018). Presence of gaps showed a real alteration of connectivity in canaliculi also - without decrease in lacunae number - preventing fluorescein to perfuse through bone porosities (lacunae and canaliculi). Besides, lacunae area does not increase with HLU in both temperatures, according to others HLU studies (Qing & al. 2012, Bach Gansmo & al., 2016; Zhang & al, 2019). This connectivity alteration could be explained by intracortical remodelling or PLR preferentially in canaliculi, as observed in glucocorticoid or lactation-induced bone loss studies (Fowler & al., 2017; Kaya & al., 2017). Moreover, increased expression with HLU of PLR gene markers at 22°C (*Ctsk*, *Trap*, *Mmp13*) support the hypothesis of a PLR activity.

Reduced canaliculi and dendrite connectivity may contribute to impaired bone response to mechanical loading, and to reduce viability in osteocytes, as nutrients and wastes are transported through canalicular network and essentials biochemical signals circulate through cell-cell contact. As more osteocyte connectivity is reduced, this may lead to further stress, leading to increased expression of RANKL, as observed in 22°C HLU mice in our study. If no evidence of alteration of osteocyte or canalicular network were found at 28°C with HLU, longer HLU period should be performed to see if any alterations in both networks happen. Indeed, 22°C mice showed higher cortical bone loss than at 28°C with HLU and because bone loss plateau was not observed in cortical bone compared to trabecular bone after 14 days HLU, longer HLU period to attain cortical bone loss plateau at thermoneutrality should allow to observe osteocyte and/or LCN networks alterations at 28°C.

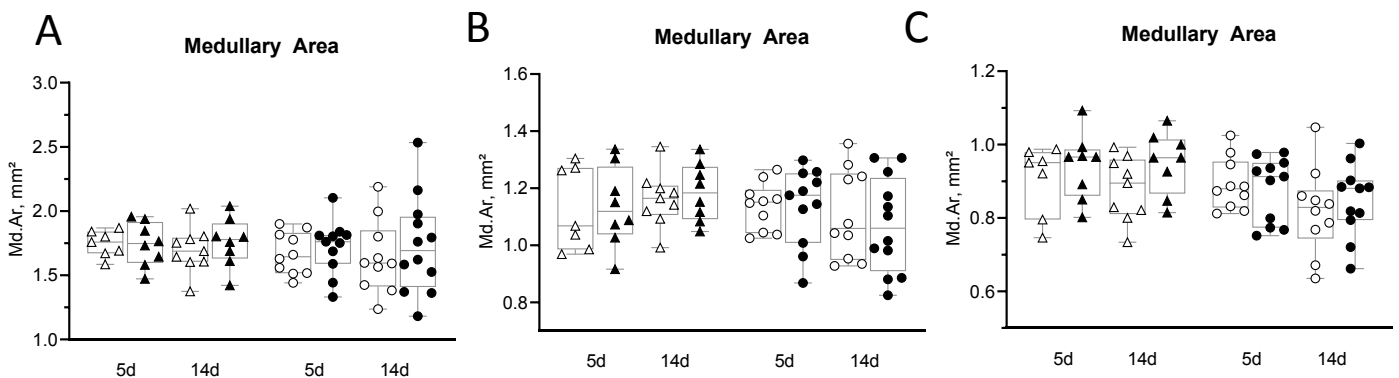
This study presents some limitations. First, genes expressions analysis was made on cortical bone compartment without bone marrow to obtain an enriched-osteocyte sample. However, this sample also contain, to a fewer extent, osteoclasts, osteoblasts and endothelial cells. In this way, some RANKL and OPG mRNA expressions may partly originate from osteoblasts and *Ctsk* and *Trap* mRNA expressions may partly originate from osteoclasts. Second, to confirm absence of osteocyte signalisation in thermoneutral HLU, further suspension protocol with closer time points should be perform (1,3,5 and 7 days). Indeed, we could miss transitory elevations before 5days of HLU or between 5 and 14 days of HLU.

The current study brings additional results showing importance of confounding effects of housing temperature in HLU model and draw into question the validity of some previously identified changes attributed to unloading given cold-stress on animals. Hindlimb unloading experimentation at thermoneutral temperature induce patterns of trabecular and cortical bone losses that corroborates previous work at standard housing temperatures, but standard housing temperature exacerbate bone losses, osteoclastic resorption, and induce osteocyte network alteration. Absence of osteocyte death or senescence with HLU at both housing temperatures, really ask to question previous attributed role of osteocyte in immobilisation-induced bone loss. At standard housing temperature, PLR genes overexpression and disruptions in osteocyte and LCN networks could, at least partly, explain increased resorption and subsequent bone loss. However, at thermoneutrality, no change in PLR genes and osteocyte and LCN network were found. To conclude, cause of triggers resorption activity and subsequent bone loss in HLU model is still unknown and could not be totally attributed to osteocytes.

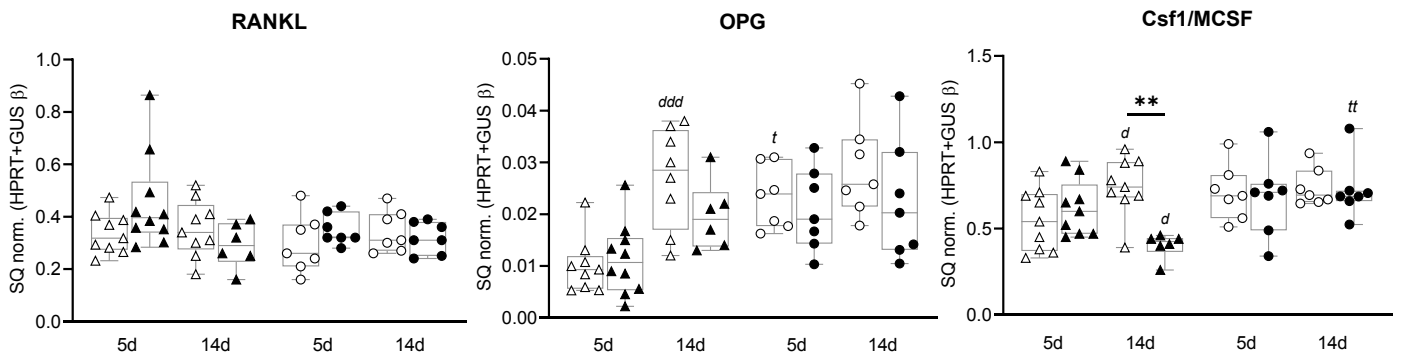
Supplementary data



Supplementary data 1 - Trabecular Thickness (Tb.Th) and Trabecular Number percent change –pre to –post HLU in femoral distal metaphysis, μ CT. CONT (empty symbols) and HLU (black symbols) mice. Triangles are for experiments performed at 22°C, circles for experiments performed at 28°C. Statistical Testing : General Linear Model (3Way ANOVA) with multiple comparisons and FDR corrections. Effect of unloading : * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$, compared to respective CONT group. Effect of temperature : t $p < 0.05$, tt $p < 0.01$, ttt $p < 0.001$, tttt $p < 0.0001$, compared to respective 22°C group. Effect of day : d $p < 0.05$, dd $p < 0.01$, ddd $p < 0.001$, dddd $p < 0.0001$, compared to respective 5days group. Data are presented as median and interquartile range.



Supplementary data 2 – Medullary area (Md.Ar) in distal metaphysis (A), mid-diaphysis (B), proximal metaphysis (C), μ CT. CONT (empty symbols) and HLU (black symbols) mice. Triangles are for experiments performed at 22°C, circles for experiments performed at 28°C. Statistical Testing : General Linear Model (3Way ANOVA) with multiple comparisons and FDR corrections. Effect of unloading : * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$, compared to respective CONT group. Effect of temperature : t $p < 0.05$, tt $p < 0.01$, ttt $p < 0.001$, tttt $p < 0.0001$, compared to respective 22°C group. Effect of day : d $p < 0.05$, dd $p < 0.01$, ddd $p < 0.001$, dddd $p < 0.0001$, compared to respective 5days group. Data are presented as median and interquartile range.



Supplementary data 3 - Gene expression in femur marrow for RANKL, OPG and Csf1/MCSF. CONT (empty symbols), HLU (black symbols) mice. Triangles are for experiments performed at 22°C, circles for experiments performed at 28°C. Gene expression levels were normalized with two reference genes HPRT and Gusβ. Statistical Testing : General Linear Model (3Way ANOVA) with multiple comparisons and FDR corrections. Effect of unloading : * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$, compared to respective CONT group. Effect of temperature : t $p < 0.05$, tt $p < 0.01$, ttt $p < 0.001$, tttt $p < 0.0001$, compared to respective 22°C group. Effect of day : d $p < 0.05$, dd $p < 0.01$, ddd $p < 0.001$, dddd $p < 0.0001$, compared to respective 5days group. Data are presented as median and interquartile range.

Supplementary data 4 – Total length of canaliculi/dendrite per lacunae/osteocyte. Image analysis of segmented DIL and Fluorescein labeling in an area of 29440 μm^2 , Image J. Statistical Testing : General Linear Model (3Way ANOVA) with multiple comparisons and FDR corrections. Effect of unloading : * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$, compared to respective CONT group. Effect of temperature : t $p < 0.05$, tt $p < 0.01$, ttt $p < 0.001$, tttt $p < 0.0001$, compared to respective 22°C group. Effect of day : d $p < 0.05$, dd $p < 0.01$, ddd $p < 0.001$, dddd $p < 0.0001$, compared to respective 5days group. Data are presented as median and interquartile range. 22°C 5D: n=6-8, 22°C 14D: n=8-11, 28°C 5D: n=6-7, 28°C 14D: n=6-7.

	22°C				28°C			
	5d		14d		5d		14d	
	CONT	HLU	CONT	HLU	CONT	HLU	CONT	HLU
Canaliculi length/lacunae (μm)	689.4 [579.1-795.5]	685.1 [571.4-925.1]	621.8 [512.4-678.2]	526.0 [460.7-594.6]	718.7 [633.0-827.4]	644.2 [535.0-757.1]	641.8 [509.4-756.2]	621.3 [564.2-634.8]
Dendrites length/osteocyte (μm)	587.7 [556.7-624.1]	602.3 [548.8-708.2]	478.2 [472.2-527.9]	527.6 [499.2-604.7]	567.0 [525.8-581.0]	543.5 [449.6-598.9]	523.2 [447.8-598.6]	515.0 [491.5-578.6]

Supplementary data 5 – Primers list of analysed genes.

Gene	NM Reference	Forward primer	Reverse primer
Gusb	NM_010368.1	cagattatccagagcgagta	ctctccgaccacgtattctt
HPRT	NM_013446.2	gcgtcgtgattagcgatgat	catgacatctcgagcaagtct
OPG	NM_008764.3	tcctcgtgctcctggacatc	cactcctgcttcaggactg
Sost	NM_024449.5	tcctcctgagaacaaccagac	tgtcaggaagcgggtgtagtg
RANKL	NM_011613.3	agcatcgctctgttctgta	ccatgagccttccatcatag
MMP13	NM_008607.2	gatggcactgctgacatcat	tgtagccttggactgctt
CSF1	NM_007778.4	ggagactcatgccagattg	gcctgttctgctcctcata
TRAP	NM_001102405.1 var 1	ggcaacgtctctgcacagat	ttgagccaggacagctgagt
CathK	NM_007802.4	tgaccactgccttccaatac	tgccgtggcgttatacatac
FOXO3	NM_019740	cctgtcctatgccgacctga	ggttgtgccggatggagttc
DDIT3	NM_007837	ggagctggaagcctggatg	ggatgtgccttgacctctg
P27	NM_009875	gcctgactcgtcagacaatc	ttacgtctggcgtcgaaggc
P21	NM_001111099.2	ttgtcgtgtcttgactct	atctcgcttggagtgatag
P53	NM_001127233.1	acatgacggaggtcgtgaga	taaggataggtcggcggttc
Map1lc3b	NM_001364358.1 var 2	gaagtgatcgtcggcgaggt	cggatgagccggacatcttc
Atg5	NM_053069.6 var 1	agctgcacacactggagat	ggttccagcaatggctcta
Becn1	NM_001359820.1 var 3	tggagaaccaggtgcgctac	catggagcagcagcactgtc

Papier 2 – HINDLIMB UNLOADING-INDUCED BONE LOSS BEARS NO RELATIONSHIP WITH BONE MARROW ADIPOSE TISSUE IN THERMONEUTRAL CONDITION

Carmelo MASTRANDREA*, Laura PEURIERE*, Marie-Thérèse LINOSSIER, Natalia Maria ZAPATA-LINARES, Laurence VICO, Xavier HOUARD, Marie-Hélène LAFAGE-PROUST.

* *co-premiers auteurs*

Introduction

Bone Marrow Adipose Tissue (BMAT), once thought little more than a cellular filler for non-haematopoietic bone marrow, is now regarded as an important regulator of organism-wide homeostasis. In humans, BMAT begins to expand in the bone marrow compartment at pre-adolescence, reaching up to 70% of the BM volume in skeletally mature young adults. This process develops from the peripheral to axial skeleton and continues through ageing as well as in pathological conditions (Suchacki & al, 2017). BM adipocytes derive from a subgroup of multi-potent stem cells frequently referred to as Skeletal Stem Cells (SSCs, Bianco & al., 2015) or Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cells (BMSCs) that can also give rise, *in vivo*, to chondrocytes and osteoblasts. Recent studies using transcriptomic profiling of the bone marrow stromal microenvironment at the individual cell level, allowed to better characterize the heterogeneity of this population (Baccin & al 2020, Baryawno & al 2019). However, the stage of SSC differentiation at which the osteo-chondrocyte and adipocyte lineages diverge, as well the molecular mechanism that control this process, remains unclear (Zhong & al 2020).

Nevertheless, a significant body of work exists indicating links between BMAT and skeletal health. In humans, BMAT volume in the lumbar spine and hip was inversely correlated with BMD (Shen & al., 2012; Bredella & al., 2011; Schellinger & al., 2001) and with femoral BMD in adult men and women (Wehrli & al., 2000), with similar negative correlations between BMAT and femoral bone area in adolescents (Gao & al., 2015). In contrast, in younger girls the amount of marrow fat was positively associated with total bone mineral content (Newton AL & al 2013). However, comprehensive review of BMAT and fracture risk in human concluded that the few studies dedicated to this research question produced mixed results, with only very weak or non-existent associations between the two (Paccou & al., 2015). Mouse models manipulating BMAT volume in order to investigate subsequent bone parameters, also showed inverse relationships between bone and BMAT mass. Promotion of BMAT development with Troglitazone, a peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) ligand, increased BMAT volume at the expense of bone mass (Tornvig & al., 2001), while administration of a PPAR γ antagonist, thereby reducing BMAT volume, resulted in increased osteoblastogenesis. A number of genetic mouse models led to similar observations (Xiao & al., 2010; Fan & al., 2017). Postnatal Runx2 deletion induced a decreased bone mass and a parallel increased BMAT (Tosa & al., 2019). Other

works reported more contradictory results. Genetic manipulation of BMAT accumulation, via knockout of *c-kit* in mice, showed differing effects of fatless marrow on osteoclast and osteoblast surfaces, dependent on the use of either HLU (Hind Limb Unloading) (Keune & al., 2017) or ovariectomy (Iwaniec & al., 2013) as the resorption stimulus. The mechanism often evoked to explain the inverse relationship between bone mass and marrow adiposity is the differentiation of one lineage at the expense the other. However, other mechanisms exist via which BMAT may influence bone, for example BMAT produces both RANKL and MCSF (Goto & al., 2011; Li & al., 2018; Lanotte & al., 1982), recruiting osteoclasts and increasing bone resorption. It is therefore important to further investigate production of these molecules within the bone marrow compartment during a pro-resorptive state.

HLU is a commonly used rodent model that produces a pro-resorptive state in the bones of the unloaded limbs leading to bone loss. Changes to osteoclastic and osteoblastic activity seem dependent on the age and strain of animal used (Amblard & al., 2003); whilst increases to osteoclastic resorption appear commonplace in mice and adult rats, attenuation to osteoblast activity seems restricted to younger rats. In addition to bone loss, HLU is also known to result in expansion of BMAT within the hind limbs of rodents (Gerbaix & al., 2017; Ahdjoudj & al., 2002) with ongoing discussion as to how the two are precisely related.

Recently, several different investigators questioned the suitability of standard laboratory housing temperatures for experimental rodent research, especially within the scope of skeletal research (Iwaniec & al., 2016; Turner & al., 2014; Martin & al., 2019; McKie & al., 2019). Stemming from work initially published in 1979, significant metabolic consequences of standard laboratory housing (20 to 22°C) compared to thermoneutral housing (30 to 32°C) were identified in mice. Resting oxygen consumption was some 35% lower in animals kept at 33°C compared to those kept at 20°C (Trayhurn & al., 1979). The unquestionable role of energy balance in skeletal homeostasis (Motyl & al., 2017) commands further understanding of the role of temperature in numerous different rodent models especially in HLU because of behavioural differences between HLU mice and their control counterparts that may affect body heat. Furthermore, the previously described skeletal consequences of housing lower temperature in unchallenged juvenile and adult mice (Iwaniec & al., 2016; Martin & al., 2019) with reduced bone apposition rate and reduced trabecular mass as well as in ovariectomized mice (Chevalier & al., 2020), only serves to reinforce the need for further research in this particular field. Furthermore, the effect of thermoneutral housing is of further interest in this study due to the known effects of temperature and energetic metabolism on BMAT (Iwaniec & al., 2016; Cawthorn & al., 2016, 2014; Devlin & al., 2011, 2016; Ecklund & al., 2010; Fazeli & al., 2012; Turner & al., 2011).

In this context, we hypothesized that thermoneutrality would alter bone and BMAT response to unloading and that BMAT would influence bone response to unloading. To test the first hypothesis we performed HLU experiments at 22°C or 28 °C room temperatures in young mature male C57BL/6 wild type (WT) mice, a well characterized model (Amblard & al., 2003), and compared them to age-matched

and pair-fed controls. Since BMAT expands with age and HLU-induced bone loss is affected by aging, we performed similar experiments in older mice. To test the second hypothesis, we performed HLU in Berardinelli-Seipin Congenital Lipodystrophy knock-out (BSCL2^{-/-}) mature mice. Deletion of BSCL2 in C57BL/6 mice produces a generalised progressive lipodystrophy, resulting in minimal to non-existent systemic and marrow fat deposits in adult animals (Dollet & al., 2014; Liu & al., 2014). Early adipocyte differentiation is halted, and incorporation of lipids into fat droplets is inhibited.

The use of C57BL/6 mice is commonplace in HLU studies, resulting in reproducible bone losses in the trabecular and cortical bone compartments of the hindlimbs. By using Wild-Type (WT) and knockout (BSCL2^{-/-}) C57BL/6 mice, this study aims to further quantify the role of BMAT in-vivo, whilst tightly controlling environmental parameters that could influence metabolic and bone homeostatic processes. We will use HLU to induce a pro-resorptive bone state in WT and BSCL2^{-/-} animals, in order to further quantify the role of BMAT during bone resorption. As the majority of pre-existing and similar in-vivo work experimented on animals housed in standard laboratory conditions (20°C to 22°C), we will also describe bone and BMAT changes in the hind limbs of wild-type animals housed in standard laboratory and thermoneutral conditions, as a secondary objective.

Methods

Mice

16-week-old male inbred C57BL/6J mice (WT) were purchased from Charles River Laboratories (Saint Germain Nuelles, France). Bernardinelli-Seipin Congenital Lipodystrophy type 2 protein (BSCL2, namely Seipin) knockout (K) mice were kindly provided by the Centre de Recherche Saint-Antoine (UMRS 928, Paris, France). They were generated on a C57BL/6 background. We defined Adult animals as being 16-weeks of age, and Mature animals as being 40-weeks of age, at the start of acclimatization. Dependent on their age and genotype, all animals can be identified as belonging to one of the following 10 groups: 14-day Adult Wild-Type HLU (14AWH), 14-day Adult Wild-Type Control (14AWC), 14-day Mature Wild-Type HLU (14MWH), 14-day Mature Wild-Type Control (14MWC), 14-day Adult Knockout HLU (14AKH), 14-day Adult Knockout Control (14AKC), 14-day Adult Wild-Type HLU at 22°C (14AWH22), 14-day Adult Wild-Type Control at 22°C (14AWC22). Other than the two groups kept at 22°C, all animals were acclimatized and housed at 28°C. All animal experiments and procedures were performed in accordance with the European Community standards for the protection of animals used for scientific purposes, following approval from the local ethical committee (201611231457342-V6, CEEAL-UJM N°98, Saint Etienne).

Suspension Protocol

During acclimatization mice were housed individually in specialized hind-limb unloading cages for a period of 4 weeks, with standard animal chow (SAFE Premium Scientific Diet, Augy, France) and water provided ad libitum. Animals were housed at either a thermal neutral temperature ($28\pm 1^\circ\text{C}$), or at standard laboratory temperature ($22^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$), for the entirety of the experiment, in a light-controlled environment (12-h light/12-hr dark cycle). Recordings of animal weight and food consumption were taken every 2 days during the acclimatization period, and every day during the HLU period. During the final week of the acclimatization period, mice were paired according to weight, and randomly assigned to their respective control or HLU group. During the HLU period, control animals were given food equal in weight to that eaten by their respective paired HLU mouse, with food being provided ad libitum to HLU mice. Hind-limb unloading was achieved as previously described (Farley & al., 2020). Briefly, thin metal wire was covered with adhesive bandaging (Tensoplast, BSN Medical, Le Mans, France) to prevent direct contact between the metallic surface and mouse tail. The animal was anaesthetised with isoflurane, and its tail attached to the distal end of the covered wire with three thin strips of identical adhesive bandaging. Care was taken to ensure adequate and secure fixation whilst minimizing risk of ischaemic damage to the distal tail. Once secure, the proximal end of the wire was fixed to a rail system inside the cage via a pivot, which allowed the mouse to access the provided food and water, the entirety of the cage, and to turn with 360° of rotational freedom. The rail system could be easily adjusted during the HLU period to ensure maintenance of a 30° angle of suspension with the cage floor. At the end of the experimental period, animals were euthanised via cervical dislocation following high-dose isoflurane anaesthesia. When required for histomorphometry analyses, intra-peritoneal injections of tetracycline (25mg/kg in 0.9% normal saline), were given during the HLU period on days 7 and 12.

Experiment 1 – Thermoneutrality

The aim of this experiment was to analyse the effect of ambient temperature on the HLU model. Animals were divided into one of the following groups: 14-AWTH22, 14-AWTC22, 14-AWTH, or 14-AWTC. It is important to note that despite true thermoneutrality for mice existing between 30°C to 33°C , temperatures approaching 30°C show are used for thermoneutral studies, with the majority of metabolic differences already abolished by 30°C (Trayhurn & al., 1979).

Experiment 2 – HLU and BMAT in WT Animals

This aim of this study was to investigate temporal changes in bone parameters during HLU at thermoneutral temperature, as well as the effects of HLU on BMAT, animals were divided into one of

the following groups: 14-day Adult Wild-Type HLU (14AWH), 14-day Adult Wild-Type Control (14AWC), 14-day Mature Wild-Type HLU (14MWH), 14-day Mature Wild-Type Control (14MWC).

Experiment 3 – HLU in BSCL2^{-/-} Animals

This aim of this study was to investigate the role of BMAT on HLU, and how a lack of BMAT may change bone losses during mechanical unloading. Animals were divided into one of the following groups: 14-day Adult Wild-Type HLU (14AWH), 14-day Adult Wild-Type Control (14AWC), 14-day Adult Knockout HLU (14AKH), and 14-day Adult Knockout Control (14AKC).

In the three experiments, bone analyses included μ CT analysis of trabecular and cortical envelopes, histomorphometry, immunofluorescence and gene-expression, as well as measurements in serum. BMAT was measured in experiments 2 and 3.

Micro CT analyses

In-vivo trabecular bone longitudinal analysis

During the final week of acclimatization, an in-vivo acquisition of the distal 1/3 of the femur and proximal 1/3 of the tibia were acquired in anaesthetised animals, using a vivaCT 40 scanning device (Scanco Medical, Bassersdorf, Switzerland), voxel size 10.5 μ m³, integration time 200ms. Following scanning, the animals were immediately returned to the acclimatization room. Trabecular parameters were taken from a 60 slice (630 μ m thick) region of interest from the distal femoral and proximal tibial metaphyses, away from any radiological evidence of the growth plate (Gauss Sigma 1.5, Gauss Support 2, Threshold 180). During the morning of the final day of the HLU period, animals were again scanned, with exactly the same parameters as stated above.

Ex-vivo μ CT cortical bone acquisition

After animal death, the left limb bones were removed, cleaned, and placed into a 20% ethanol solution for scanning. The left femur and tibia for each animal were scanned in their entirety (voxel size 10.5 μ m³, integration time 200ms), thereby allowing us to precisely divide the bones into specific regions of interest. Cortical parameters in 630 μ m-thick ROIs were measured at three positions in the femur: 25%, 50%, and 75% of total bone length. In the tibia, similarly thick ROIs were measured: 2mm below the growth plate, 50% of fibula length, 50% of tibia length, and 1mm above the distal tibio-fibular junction (Gauss Sigma 1.5, Gauss Support 2, Threshold 180).

Bone Marrow Adiposity (BMAT) μ CT measurement

Osmium Tetroxide Staining - Following cortical scans, the left tibia was decalcified in 0.5M Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) solution at 4°C for 14-days, with the solution being replaced

every 2-days to improve chelation and aid bone decalcification, and radiological confirmation of complete decalcification at the end of this period. The distal tibia was then cut at a level just below the distal tibio-fibular junction, and placed in an inverted orientation in a solution of 1% Osmium Tetroxide, 2.5% Potassium Dichromate in water, for 72-hours at room temperature, as previously described (Scheller & al., 2014).

μCT BMAT measurement - Following a brief washing, the stained tibiae were scanned (voxel size 10.5μm³, integration time 500ms), and analyses made at exactly the same position at which the trabecular parameters were obtained (Gauss Sigma 0.5, Gauss Support 3, Threshold 350), allowing direct correlations to be drawn between fat volume and trabecular bone in the proximal tibial metaphysis.

Histomorphometry analysis

Histomorphometry analyses were performed on non-decalcified bone sections. The distal 1/3 of each Femur was separated from the proximal 2/3 with a precision diamond-wire saw (Escil, Chassieu, France). These pieces were then completely dehydrated in sequentially increasing concentrations of ethanol, and embedded in methylmetacrylate-based medium as previously described (Chappard & al., 1987, *Bone embedding in pure methyl metacrylate at low temperature preserves enzyme activities*). All analyses were performed in the distal metaphysis within an area 1.5mmx1.5mm in size, on 9 μm frontal sections that were cut using a tungsten-carbide-bladed microtome (Leica SM2500E, Wetzlar, Germany).

Modified Goldner staining permitted measurements of Bone Volume (BV/TV, %), Trabecular Thickness (Tb.Th, μm), and Osteoid Surface (OS/BS, %) to be taken for each Femur. Osteoclast Surface (Oc.S/BS, %), Osteoclast Number (N.Oc/B.Pm, cells/mm), and Osteoclast Length (Oc.Le, μm) quantification was performed following staining for Tartrate-Resistant Acid Phosphatase (TRAP). Finally, dynamic formation parameters, including Mineral Apposition Rate (MAR, μm/day), Doubled-Labeled Surface (dL.S/BS, %) and Bone Formation Rate (BFR/BS, μm³/μm²/day), were calculated on tetracycline-labelled sections. All analyses were performed using an automatic image analyser (BONE software), and software developed in-house and coupled to a digitizing table (Summasketch, Summagraphics, Paris, France), on 5 non-sequential sections for each staining protocol.

Immunohistochemistry (IHC) analyses

IHC protocol - Following euthanasia, 4% Paraformaldehyde (PFA) perfusion, via catheterisation of the left ventricle, allowed rapid fixation of the tissues of the lower limb, with over-pressurisation prevented by careful sectioning of the right atrium. Bones were then decalcified in EDTA for 2-weeks as previously described, and placed into a solution comprising 2% polyvinylpyrrolidone (PVP) and 20% sucrose in water for 48-hours at 4°C, before being embedded in an 8% porcine gelatin (gel strength 90-110g, G6144

Sigma), 2% PVP, 20% sucrose mixture and frozen at -80°C . Axial sections $30\text{-}\mu\text{m}$ thick of the Tibia and Femur were then cut sequentially using a cryo-microtome (HM560, ThermoScientific, USA), fixed to gelatin-coated slides, and stored at -20°C . On removal from -20°C storage, slides were heated for 10-minutes at 37°C , rehydrated in 1M Tris Buffered Solution (TBS) for 10 minutes at room temperature, permeabilized in 0.1% Tween-TBS (TTBS) for 10 minutes at room temperature, blocked in blocking solution containing bovine serum in TTBS for 75-minutes at 4°C , and then blocked in Abcam Protein Block (ab64266, Abcam) for 20-minutes at 4°C . Following these steps, the sections were incubated at 4°C overnight in a solution of primary antibody, with subsequent washing and complementary secondary antibody exposure for 45-minutes at room temperature. Nuclei were counterstained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) for 10-minutes at 37°C , and sections were mounted in Vectashield (Vector laboratories, Burlingame, USA), and coverslips sealed with nail polish.

Primary antibodies used in staining protocols included: Endomucin (sc65495, Santa Cruz, diluted 1:400), CD31 (AF3628, R&D Systems, diluted 1:200), Perilipin-A (AF diluted 1:100), Laminin (L9393, Sigma Aldrich, 1:400). Complementary secondary antibodies included: Donkey anti-Rat 550 (SA5-10027, Thermofisher), Donkey anti-Goat 488 (A11055, Thermofisher), and Donkey anti-rabbit 546 (A10040, Thermofisher).

Acquisition and interpretation of IHC images - We acquired confocal $40\mu\text{m}$ -thick stacks of the immunolabelled section using a z-step of $1.94\ \mu\text{m}$, on a FLUOVIEW FV1200 laser scanning confocal microscope, (Olympus, Tokyo, Japan) equipped with the FV10-ASW4.1 imaging software. Images were processed with ImageJ software, through a process of maximum intensity stack projection, background subtraction, gaussian filtering, binarization, and particle analysis, as previously reported (Caire & al., 2019). Measured parameters included: Cortical Endosteal Vessel Density, Total Bone Marrow Vessel Density, and Adipocyte Area.

Gene Expression Analyses

Following euthanasia, the right and left leg were dissected, and the Soleus, Tibialis Anterior and Extensor Digitorum Longus isolated and weighed using a precision balance (Sartorius Basic BA210, Göttingen, Germany). Following subsequent removal of muscle and cleaning of the bones, the Tibia and Femur were separated into their respective cortical and marrow compartments via flushing with Phosphate Buffered Solution. 5ml of TRI Reagent (Sigma Aldrich, St Louis, USA) was added to the flushed marrow, which was then stored at -80°C . The remaining cortical bone was placed in a cryotube, and snap-frozen in liquid nitrogen, before being stored at -80°C . It is important to note that the animals used in the mRNA experiments were not injected with tetracycline at any point, to prevent any confounding results as a direct consequence of the administration of this anti-microbial compound.

RNA extraction and analysis were performed as previously described (robin paper). Briefly, we purified the RNA using an RNeasyPlus Mini Kit (Qiagen Inc, Valencia, CA, USA), assessed quality with an Experion automated electrophoresis station (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), and quantified concentration with Ribogreen (Life Technologies, Eugene, OR, USA). Complementary DNA (cDNA) was synthesized from 2µg of RNA extract, using an iScript cDNA synthesis kit (Bio rad, Hercules, CA, USA). For cortical bone, crushing pre-extraction was performed using steel balls in a Mikro-Dismembrator S mixer mill (Sartorius, Gottingen, Germany).

Serum Analyses

Fasting blood glucose measurement - On the morning of the final day of suspension, food was removed from the animal cages. 6-hours later, venous blood glucose was measured at the tail immediately following euthanasia (Accu-Check Performa, Roche, Germany).

Other measurements - Blood was collected following euthanasia in 600µl blood collection tubes (BD Microtainer, USA), spun at 2000g for 10-minutes (VWR MicroStar 12 centrifuge, Pennsylvania, USA), and the serum collected and frozen at -80oC until analysed. All samples were collected between the hours of 0900 to 1100. Analyses were performed for Corticosterone, Testosterone, C-Terminal Telopeptide (CTX), Insulin-Like Growth Factor 1 (IGF1), Leptin and Irisin.

Bone marrow endothelial cell count using Flow Cytometry

Following euthanasia, the legs were dissected and muscles weighed a similar fashion to the mRNA experiments. The epiphyses of the tibia and femur were then removed, trabecular bone disrupted with a 30G needle, and bones placed inverted inside a perforated 500µl Eppendorf, which in turn was placed within a 1.5ml Eppendorf. One tibia and one femur were placed in each tube, so that the marrow obtained was pooled for each individual leg. Centrifugation at 8000g for 30-seconds was performed at room temperature, and the marrow collected in the larger 1.5ml Eppendorf, with the cortical bone then discarded. The cells of the marrow were gently agitated in a solution comprising Collagenase IV (1mg/ml) and 1% Bovine Serum, in HANKS balanced salt solution, for 30 minutes at 37°C. Cells were marked using different combinations of fluorophore-conjugated antibodies including: BV421 Rat anti-mouse CD45 (BD Biosciences 563890), CD31 APC (MiltenyiBiotec 130-102-571), Endomucin FITC (Santa Cruz sc-65495 FITC), Rat IgG2a-APC (Miltenyi Biotec 130-102-655), Rat IgG2a-FITC (Santa Cruz sc-2831 FITC), and BV421 Rat IgG2b K isotype control (BD biosciences 562603). Following this, red cells were then lysed in PharmLyse 1X for 10 minutes at 4°C. Cells were then washed, re-suspended in 1% Foetal Calf Serum in PBS, and concentration measured in order to ensure consistent cell numbers for each analysis. Finally, cells were exposed to 7AAD (Biolegend 420403) for 10-minutes at 4°C to ensure adequate elimination of dead cells, and fixed in 1% PFA. Analysis was performed on a

FACSCCanto II flow cytometry machine (BD Biosciences, Allschwil, Switzerland). For CD31 and Endomucin, a threshold of 104 was used as the defined level for positive staining, in order to identify ‘H-cells’.

Statistical Analyses

Statistical analyses were performed using Prism software (Graphpad Software, USA). Physiological data of animal weight and food consumption during the acclimatization and HLU protocols were analysed by repeated-measures Two-Way ANOVA (Time and Group) with post-hoc testing performed with Sidak Multiple Comparisons. To assess and validate unloading at 28°C, t-tests were performed to compare the unloaded (*14AWU_{TN}*) to the control (*14AWC_{TN}*) mice; $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), or $p < 0.001$ (***). For all subsequent comparisons (housing temperature, HLU duration, animal age or genotype), data were analysed with Two-Way ANOVA (Group and Unloading), for 5-day vs 14-day (5AWTN vs 14AWTN), for Mature vs Adult (14MWTN vs 14AWTN), for 22°C vs 28°C (14AWST vs 14AWTN), and for BSCL2^{-/-} vs Wild-Type (14AKTN vs 14AWTN). # = effect of unloading, with # = $p < 0.05$, ## = $p < 0.01$, ### = $p < 0.001$, #### = $p < 0.0001$. † = group effect vs 14AWTN mice, with † = $p < 0.05$, †† = $p < 0.01$, ††† = $p < 0.001$, †††† = $p < 0.0001$. If interaction was found (Ø) with two-Way ANOVA, subsequent post-hoc test statistical significances were used to assess reasons for this interaction. All data are presented as mean \pm SD unless otherwise stated. In-vivo μ CT trabecular bone results are reported as percentage change from the pre-HLU to post-HLU scans (21 days between scans).

Results

Within both the Acclimatization and HLU period, we noticed significant differences in both animal weight and food consumption (Figure 1). Mice kept at 28°C were significantly heavier than those kept at 22°C ($29.0 \pm 0.3\text{g}$ vs $27.7 \pm 0.3\text{g}$, $p=0.003$. 14AW vs 14AW22 respectively), despite their daily food consumption being 23% lower ($3.7 \pm 0.2\text{g}$ vs $4.8 \pm 0.2\text{g}$, $p < 0.0001$. 14AW vs 14AW22 respectively). During the HLU period, both groups reduced their daily food intake considerably, resulting in reductions in body weight. In those mice kept at 28°C, there was a return to pre-HLU daily food consumption before the end of the first week, with a gradual increase in body weight. Control mice returned to their pre-HLU weight, whereas HLU mice recovered more slowly not achieving pre-HLU values before the end of the protocol. In mice kept at 22°C, daily food consumption showed a much faster response, with intake on HLU day 3 considerably higher than that during acclimatization. Following this rapid

rise, food consumption in HLU mice remained far above that during acclimatization, whilst food consumption in Control animals returned to pre-HLU levels. By the end of the HLU protocol, daily food consumption was significantly different in animals kept at 22°C ($4.3 \pm 1.1\text{g}$ vs $5.8 \pm 0.7\text{g}$, $p = 0.017$), whereas it was not in animals kept at 28°C ($3.5 \pm 0.9\text{g}$ vs $4.0 \pm 1.0\text{g}$, $p=0.85$, in Control and HLU, respectively). Serum levels of Corticosterone and IGF-1 in all groups, irrespective of housing temperature or HLU/Control allocation, were no different on the last day of the experiment (day 14). Serum Leptin concentration was significantly lower in mice kept at 22°C, with no difference in serum Corticosterone levels. (Fig.2G,H).

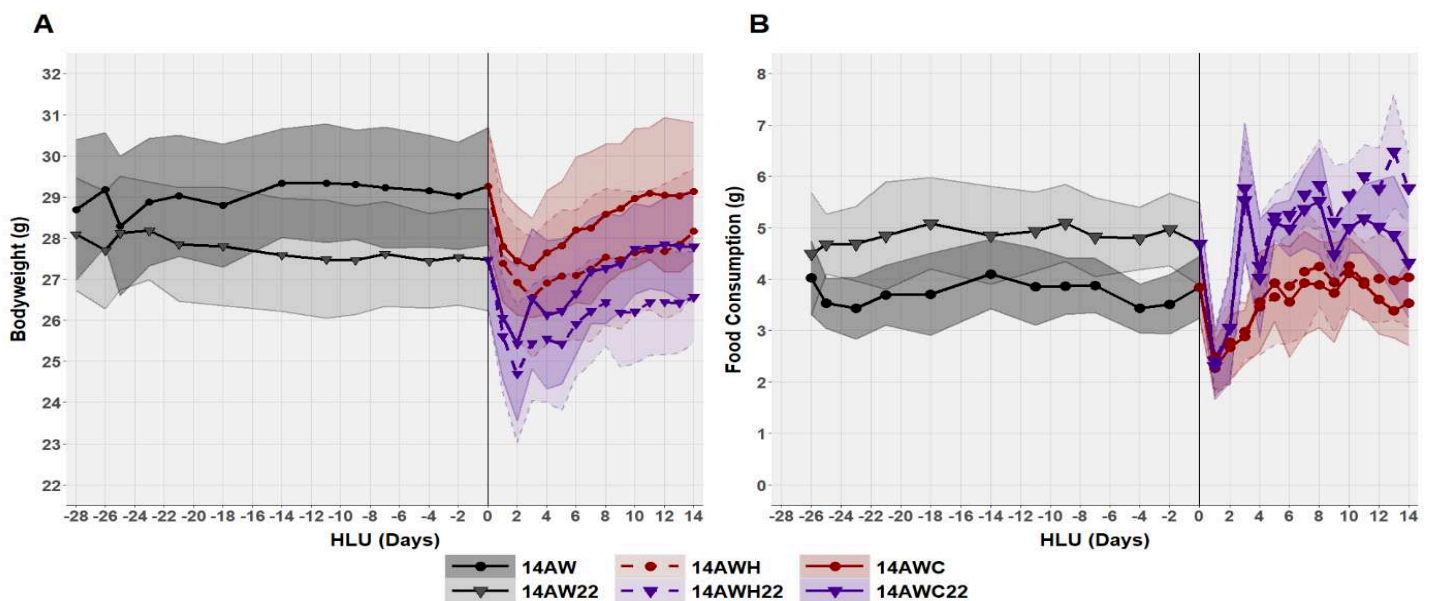


Fig 1: Body weight (A) and food consumption (B) of adult WT mice kept at 28°C (14AW) or 22°C (14AW22). HLU proceeded from day 0 to day 14, preceded by Acclimatization between days -28 to 0. Two-way repeated-measures ANOVA identified significant differences between animals kept at 22°C and 28°C, during Acclimatization, for both body weight ($p = 0.003$) and food consumption ($P < 0.0001$). During the HLU period there were significant (?) reductions in body weight for all animals, with a return to Acclimatization body weights in Control (14AWC and 14AWC22) but not HLU (14AWH and 14AWH22) mice at both 28°C and 22°C (was mice bw at d14 of HLU different between 22 & 28? if so state it). Whereas food consumption in animals kept at 28°C returned to Acclimatization levels, it was much higher in HLU mice at 22°C, with the difference in food consumption between HLU (14AWH22) and Controls (14AWC22) achieving significant difference on HLU days 13 and 14 ($p = 0.0166$, Sidak's multiple comparisons).

HLU effects on bone mass and structure

In those animals kept at 28°C, femoral metaphyseal BV/TV losses in HLU animals ($-32.4 \pm 9.7\%$) were much greater than those in Controls ($-8.7 \pm 9.3\%$), $p < 0.0001$ (Fig.2A). These bone losses were predominantly the result of reductions in trabecular thickness ($+2.0 \pm 6.2\%$ vs $-14.1 \pm 7.0\%$, $p < 0.0001$), rather than trabecular number, and appeared to be driven by elevations in osteoclast resorption surfaces ($2.3 \pm 0.6\%$ vs $3.9 \pm 0.8\%$, $p = 0.0006$) rather than changes in bone formation rate ($0.056 \pm$

0.027 μ m/day vs 0.057 \pm 0.042 μ m/day), 14A WTC vs 14A WTH for all (Fig.2B). Changes in tibial metaphyseal BV/TV were similar (supp Fig X).

In those mice kept at 22°C, we identified greater reductions in femoral metaphyseal BV/TV in HLU animals than at 28°C (-25.6 \pm 9.4% 14A WC22 vs -40.4 \pm 11.3% 14A WH22, p = 0.0224), although the differences between Control and HLU animals was significantly lower. These losses were again the result of reductions in Tb.Th (-6.0 \pm 5.0% 14AWC22 vs -18.6 \pm 7.9% 14A WH22, p = 0.0021), rather than Tb.N, with associated elevations in osteoclast surfaces (6.6 \pm 0.4% 14A WC22 vs 8.0 \pm 1.3% 14A WH22, p = 0.0085) (Fig.2A).

Influence of housing temperature - Both Tibia and femoral BV/TV and resorption were influenced by housing temperature in controls. Indeed, we identified statistically significant differences between Control animals kept at 22°C and 28°C, for BV/TV (p = 0.0014) and Tb.Th (p = 0.0353), in addition to Oc.S (p < 0.0001) and Oc.N (p < 0.0001). In addition, changes in femoral Trabecular BV/TV (Fig.2A) was also significantly altered by housing temperature (14.7% of total variation, p = 0.0002), in addition to the effects of unloading (35.2% of total variation, p < 0.0001), without any interaction effect, when compared with two-way ANOVA (Tukey's multiple comparisons). Changes in Tb.Th (HLU: p < 0.0001, Temperature: p = 0.0035) were also different, however there were no statistically significant effects of HLU or housing temperature on Tb.N, Conn.D, or Tb.Sp. Analysis of histomorphometry results identified similar effects of housing temperature and HLU on Oc.S (housing temperature: 80.6% of total variation, p < 0.0001. HLU: 10.7% of total variation, p < 0.0001) and Oc.N (housing temperature: 82.1% of total variation, p < 0.0001. HLU: 4.1% of total variation, p < 0.0055) (Fig.2A,B).

Changes in cortical bone parameters were also influenced by both HLU and housing temperature, the magnitude dependent on the position within the femur. Two-way ANOVAs identified differences attributable to HLU for Ct.Th (18.1% total variation, p = 0.0071) and Ct.Ar (13.5% total variation, p = 0.0171) at the distal femoral diaphysis, Ct.Th (6.6% total variation, p = 0.03) at the middle femoral diaphysis, and Ct.Th (14.2% total variation, p = 0.0082) and Ct.Ar (17.1% total variation, p = 0.0045) at the proximal femoral diaphysis. Changes attributable to housing temperature were identified for Ct.Th (50.6% of total variation, p < 0.0001) and Ct.Ar (19.2% of total variation, p = 0.0037) at the middle femoral diaphysis, and for Ct.Th (25.9% of total variation, p = 0.0006), Ct.Ar (20.0% of total variation, p = 0.0023), and Med.Ar (14.1% of total variation, p = 0.02) at the proximal femoral diaphysis. Globally, there was a trend towards reduced Ct.Th and Ct.Ar across all the entire femur, attributable to both HLU and housing temperature, with non-significant increases in Med.Ar. Interestingly, there was a slight increase in volumetric BMD in the 14AWH when compared to 14AWC at all analysed levels of the femur, a trend not seen in those animals housed at 22°C (Fig.2C,D,E).

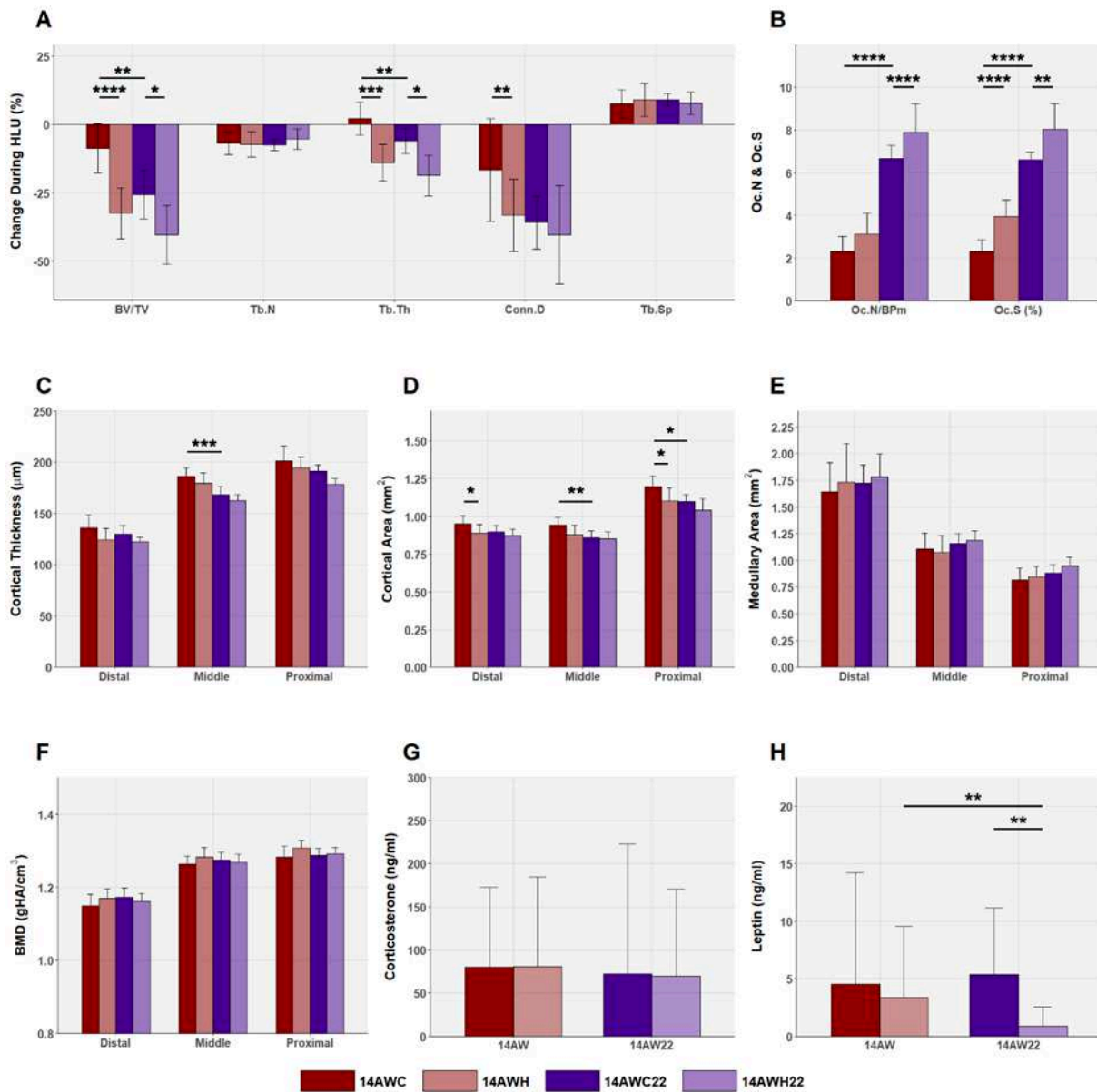


Fig 2: Femoral Trabecular (A) and Cortical (C-F) bone measurements following 14-days HLU. (A) Figure shows proportional trabecular bone changes from day 0 to day 14 HLU, with obvious reductions in BV/TV and Tb.Th between HLU and Control animals. Two-Way Repeated Measures ANOVA identified both HLU and housing temperature as statistically significant influences on BV/TV ($p < 0.0001$, $p = 0.0002$) and Tb.Th ($p < 0.0001$, $p = 0.0035$), with no interaction for either variable. There was no change in Tb.N following HLU at either housing temperature. Trabecular osteoclastic activity was elevated (B), again influenced by both HLU and housing temperature. Ct.Th (C), and Ct.Ar (D) were lower in HLU animals compared to Controls, at both 28°C and 22°C, with no interaction between variables. We identified no statistically significant differences in Med.Ar (E), with an interesting trend towards higher vBMD in animals kept at 28°C that was not seen at 22°C (F). Serum analyses identified no difference in Corticosterone levels (G) following HLU at either 28°C or 22°C, however Leptin levels were markedly reduced in HLU animals housed at 22°C (H). Values shown as mean \pm SD (A-F) or median \pm IQR (G-H). Significance shown following ANOVA with multiple comparisons: * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$, **** = $p < 0.0001$.

HLU effects on BMAT in WT Animals

Quantification of the tibial metaphyseal fat volume identified a wide range of values in all mouse groups. We did not identify any differences in proportional fat burden following HLU, in either Adult or Mature animals (Fig.3A) at 28°C. In contrast, in mice housed at 22°C, HLU had a greater tibial metaphyseal fat volume than controls mice ($18.7 \pm 7.1\%$ vs $8.9 \pm 9.8\%$ in 14AWH22 and 14AWC22 respectively), however this did not achieve statistical significance (Fig.3A). Analyses of trabecular BV/TV and fat volume showed no significant correlations, and no over-arching trends (Fig.3B). There was similarly no evidence of any statistically significant correlations between metaphyseal fat volume and Tb.Th, animal weight or weight-loss during the HLU protocol, or fasting blood glucose levels.

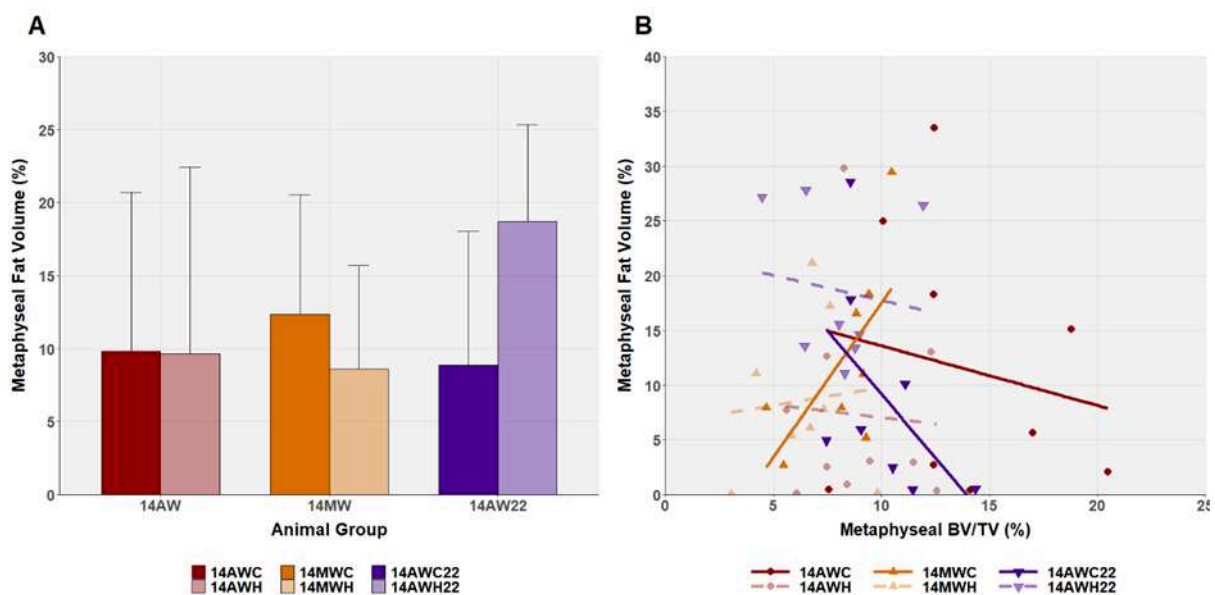


Fig. 3: (A) There was no difference in femoral metaphyseal fat volume between HLU and Control mice following 14-days HLU, for Adult Wild-Type (14AW) or Mature Wild Type (14MW) kept at 28°C, as a percentage of total metaphyseal medullary volume, within the same ROI in which femoral trabecular parameters were measured (630µm-thick section). There was an increase in metaphyseal fat volume in Adult Wild Type HLU animals kept at 22oC (14AWH22) when compared to their Control counterparts also housed at 22oC. (B) Linear correlation between fat volume and trabecular bone volume never achieved statistical significance in any animal group, and there were no obvious trends identified between these two parameters.

Effects of HLU in fatless BSCL2^{-/-} mice

BSCL2^{-/-} mice ate considerably more than WT mice throughout the acclimatization period ($4.8 \pm 0.3\text{g}$ vs $3.7 \pm 0.2\text{g}$ respectively, $p < 0.0001$), with a higher mean body weight ($30.5 \pm 0.8\text{g}$ vs $29.0 \pm 0.3\text{g}$, $P < 0.0001$) than their WT counterpart, having gained more weight by the end of the acclimatization period (Fig.4A). At the start of the HLU protocol, BSCL2^{-/-} mice lost weight as the WT animals did, however they did not regain that weight in a similar fashion (Fig.4B). Serum analyses showed significantly lower serum levels of Leptin, but much higher levels of Corticosterone (Fig.5G,H).

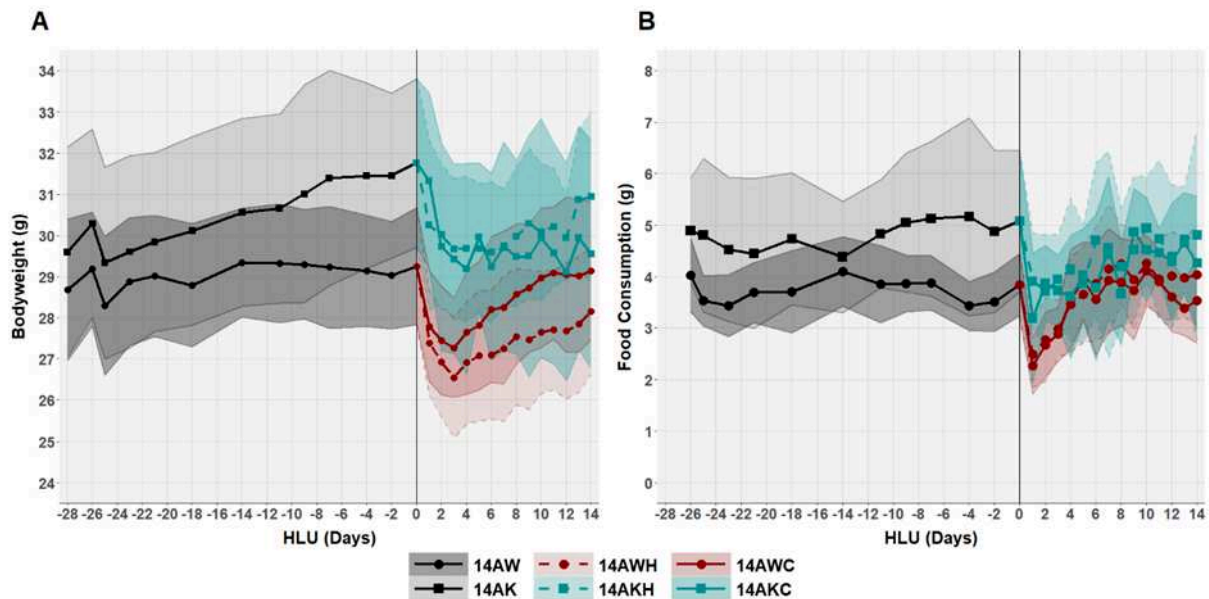


Fig 4: Body weight (A) and food consumption (B) of Wild-Type C57BL/6 mice kept at 28°C (14AW) and BSCL2^{-/-} knock-out C57BL/6 mice kept at 28°C (14AK). Two-way repeated-measures ANOVA identified significant differences between WT and BSCL2^{-/-} animals, during Acclimatization, for both body weight ($p < 0.0001$) and food consumption ($P < 0.0001$). BSCL2^{-/-} mice ate considerably more food and were heavier than their WT counterparts. At the start of the HLU protocol, BSCL2^{-/-} mice lost weight as also seen in WT animals, however they did not regain this weight as was seen in the WT mice. Food consumption in the BSCL2^{-/-} mice fell in the first few days of HLU, before quickly recovering and returning to pre-HLU levels.

Bone responses to HLU in the BSCL2^{-/-} mice followed a similar pattern to those seen in WT animals, with similar proportional differences in losses between the HLU and Control mice, accounted for by reductions in Tb.Th rather than Tb.N (Fig.5A). However, there was a striking difference in the true losses of trabecular bone in BSCL2^{-/-} mice, as total losses in both HLU and Control animals were much lower than those experienced by their WT counterparts. Whereas Control WT mice lost trabecular bone during the 2-week HLU protocol ($-8.7 \pm 9.3\%$), Control BSCL2^{-/-} mice did not. Two-Way ANOVA identified individual effects of HLU (40% of total variation, $p < 0.0001$) and BSCL2^{-/-} KO (17% of total variation, $p < 0.0001$) on BV/TV losses, without interaction. Trabecular losses following HLU in BSCL2^{-/-} mice were again driven by reductions in Tb.Th ($+4.8 \pm 5.8\%$ 14AKC, vs $-9.1 \pm 7.5\%$ 14AKH, $p < 0.0001$), rather than changes to trabecular number. In the cortical bone, two-way ANOVA analyses identified effects on Cortical Thickness of HLU and Genotype at the distal femur (11.5% of total variation, $p = 0.013$, and 18.4% of total variation, $p = 0.002$ respectively), but only of HLU at the mid (19.0% of total variation, $p = 0.0029$) and proximal diaphysis (9.7% of total variation, $p = 0.041$). HLU also imparted a significant effect on Ct.Ar at the distal (17.0% of total variation, $p = 0.0058$) and mid femoral diaphysis (13.5% of total variation, $p = 0.016$) (Fig.5C,D,E). In BSCL2^{-/-} mice we saw a global elevation in serum Corticosterone concentrations compared to adult Wild-Type mice ($p = 0.0006$, two-way ANOVA), although again there was no difference between unloaded or control animals (Fig.

5G). *BSCL2*^{-/-} mice also showed significantly lower Leptin levels compared to *14AW*_{TN} animals ($p < 0.0001$), again with no identifiable effect of unloading and no interaction (Fig.5H).

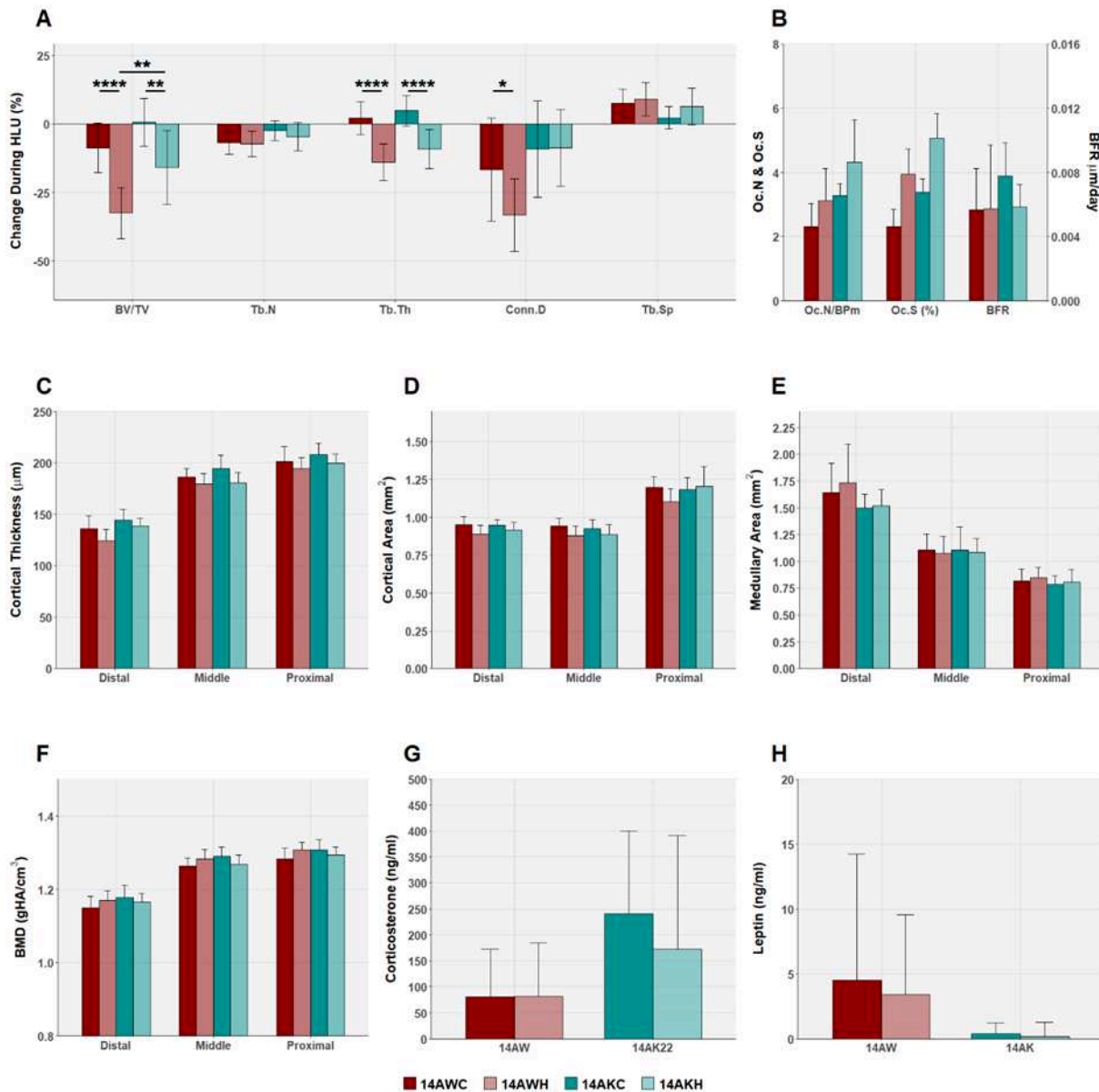


Fig 5: Femoral Trabecular (A) and Cortical (C-F) bone measurements, and serum analyses (G-H) following 14-days HLU in WT and *BSCL2*^{-/-} mice housed at 28°C. (A) Figure shows proportional trabecular bone changes from day 0 to day 14 HLU, with obvious reductions in BV/TV and Tb.Th between HLU and Control animals. Two-Way Repeated Measures ANOVAs identified both HLU and Genotype as statistically significant influences on BV/TV ($p < 0.0001$, $p < 0.0001$) and Tb.Th ($p < 0.0001$, $p = 0.038$), with significant effects of Genotype alone on Tb.N ($p = 0.0075$) and Connectivity ($p = 0.0011$). There was no interaction effect for any variables. Trabecular osteoclastic activity was elevated (B), again influenced by both HLU ($p < 0.0001$) and Genotype ($p = 0.0001$). Ct.Th (C), Ct.Ar (D), Med.Ar (E) and vBMD (F). Serum analyses identified no difference in Corticosterone levels (G) following HLU. Leptin levels (H). Values shown as mean \pm SD (A-F) or median \pm IQR (G-H). Significance shown following ANOVA with multiple comparisons: * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$, **** = $p < 0.0001$.

Discussion

Thermoneutrality and HLU

With the recent renewed interest in thermoneutral housing during animal experimentation, a wave of new research aims to clarify the role of housing temperature on factors such as exercise tolerance and metabolic rate, immune function and gut flora (Stemmer & al., 2015; Giles & al., 2017) and insulin resistance (Small & al., 2018), as well as effects on skeletal physiology (Keune & al., 2017; Iwaniec & al., 2016). We believe this is the first study to thoroughly investigate the trabecular and cortical bone changes attributable to both HLU and housing temperature in C57BL/6 mice, in both the femur and the tibia. In addition to analyses of bone parameters, we closely studied physiological parameters during a 14-day HLU protocol with a preceding 28-day Acclimatization period that allows us to now question the validity of HLU experiments in mice kept at standard laboratory temperatures.

Housed at 28°C, we found that C57BL/6 mice ate considerably less whilst maintaining a higher body mass, than counterparts housed at 22°C. This corroborates previous findings of increased metabolic rates in C57BL/6 mice housed at thermoneutral temperatures when compared to standard laboratory conditions (Scheller & al., 2014). Despite this not presenting a problem in routine animal experimentation, individual housing of mice with the concurrent inability to perform habitual temperature-retaining behaviours (such as curling up in a ball) results in a likely increased energy expenditure in HLU animals compared to Controls. By housing mice at thermoneutral temperature, this increased energy expenditure for maintenance of core body temperature is reduced or eliminated entirely. This hypothesis would explain the significant dissociation of food intake in the 14WH22 and 14WC22 mice toward the end of the HLU protocol, a finding that was not reproduced in the 14AWC and 14AWH mice housed at 28°C. Rather conclusively, this increase in food consumption was not matched by an increase in body weight in the 14AWH22 mice and indicates dramatically different baseline metabolic rates in these animals. Given that diet and metabolism are incontrovertibly linked to skeletal homeostasis (Cawthorn & al., 2014; Hamrick & al., 2008; Ricci & al., 2001; Swift & al., 2014; Talbott & al., 1998), we feared that the metabolic consequences of HLU on skeletal parameters were somewhat overlooked in the past. In order to investigate this potentially confounding effect of energetic differences in HLU at standard laboratory temperatures, we subsequently compared trabecular and cortical bone changes following HLU at both 22°C and 28°C.

Metaphyseal trabecular bone mass in the femur and tibia were considerably lower in HLU vs Control animals, as previously documented in numerous studies (Amblard & al., 2003; Ellman & al., 2014; Lin & al., 2009; Shahnazari & al., 2012; Spatz & al., 2013; Kawao & al., 2018). We additionally identified a statistically significant effect of housing temperature on BV/TV, with two-way ANOVA attributing to approximately 15% of all variation in the femur (35.2% attributable to mechanical unloading). However, neither in the femur nor the tibia did we find an interaction between the two

factors, negating somewhat our hypothesis that standard housing temperatures may confound morphometrical changes in the trabecular bone compartment of these bones during HLU. However, we clearly see that the proportional difference in BV/TV between Control and HLU animals is diminished, and with greater animal numbers this difference may have resulted in the identification of a conclusive interaction between these two factors. Interestingly, the final proportional loss in both the 14AWH and 14AWH22 mice were not significantly different ($-32.4 \pm 9.7\%$ vs $-40.4 \pm 11.3\%$ respectively, $p = 0.2763$) and may indicate that the rate of any further losses after 14-days was falling. This could suggest that both HLU groups (at 22°C and 28°C) had already passed the peak rate of bone loss, and any true interaction between temperature and mechanical unloading had passed earlier. However, the osteoclastic activity did not support this secondary hypothesis, as temperature and HLU were clearly influencing Oc.S and Oc.N independently, and osteoclastic activity at day 14 remained much higher in mice housed at 22°C. Therefore, at least within the trabecular bone compartment, we could not identify a significant interactive effect between housing temperature and HLU, although both variables significantly influenced trabecular changes over our 14-day HLU protocol.

Within the cortical compartment, we again identified significant effects of HLU and housing temperature on bone changes during HLU. Cortical thickness fell during HLU, again confirming previously documented results in mice (Ellman & al., 2014; Lin & al., 2009; Spatz & al., 2013; Simske & al., 1992). Furthermore, and as with our trabecular findings, we did not see any interaction between mechanical unloading and housing temperature. Interestingly, we did see that as cortical thickness fell, medullary area remained unchanged, suggesting that if caused by elevations to bone resorption rather than reductions to bone formation, this resorption is likely to have occurred on the periosteal surface. This is in keeping with previously published findings of increased periosteal osteoclastic activity in the femoral diaphysis of mice following a 30-day spaceflight, where once again medullary area remained unchanged (Gerbaix & al., 2017). Nevertheless, we found trends of reduced diaphyseal cortical bone thickness and area following HLU, at both 22°C and 28°C, and that these trends were found along the whole length of the femur. Similar changes were identified in the tibia, although they were most apparent proximally, with minimal differences in the mid-tibial diaphysis.

HLU and BMAT in WT Animals

Our findings of little change in BMAT volume following 14 days of HLU at close to thermoneutral temperature somewhat contradicts previously published results, where it was shown that BMAT expansion within the long bones of rodents occurs during mechanical unloading. For example, previous 2-dimensional quantification of BMAT within the femoral metaphysis of C57BL/6 mice following a 1-month spaceflight identified increases in total adipose tissue area compared to controls (Gerbaix & al., 2017), as did similar quantification of BMAT area in Wistar rats following 7-days HLU

(Ahdjoudj & al., 2002), and C57BL/6 mice following 14-days HLU (Hino & al., 2006). However, it should be noted that in all of these experiments (including that aboard the Bion M1 spacecraft, Andreev-Andrievskiy & al., 2014) mice were housed at standard laboratory temperatures (19-22°C). As previously documented by Turner & al (2018), any interpretation of BMAT changes in mice subjected to room temperature-induced cold stress should be performed carefully, as this stress alone can dramatically increase BMAT volume (Iwaniec & al., 2016; Turner & al., 2018). Our results in mice kept at 28°C may therefore be explained by thermoneutral housing, and previously identified BMAT expansion during HLU may be the result of a combination of HLU and cold stress. This hypothesis is reinforced by the changes we identified in our study between mice kept at 28°C and 22°C (Fig.3A); whereas there was no difference in tibial metaphyseal BMAT volume following HLU at 28°C, BMAT volume in unloaded animals kept at 22°C was more than 2x greater than in Controls at 22°C ($18.7 \pm 7.1\%$ vs $8.9 \pm 9.8\%$ respectively). Rather conclusively therefore, we believe that increases in BMAT volume during HLU in C57BL/6 mice may be due to a combination of mechanical unloading and cold stress, and that mechanical unloading alone does not produce similar changes. It could be hypothesised that given the significant difference physiologically in HLU models at 22°C and 28°C, especially when considering differences in food intake and energy balance (Fig.1), that BMAT expansion may be the result of a number of alternative factors that include energy intake and environmental temperature. Certainly, it is known that BMAT volume increases with calorie restriction (Cawthorn & al., 2014; Turner & al., 2018), in both rodents (Devlin & al., 2016; Turner & al., 2011) and humans (Ecklund & al., 2010; Fazeli & al., 2012), and that BMAT volume is altered by environmental temperature (Iwaniec & al., 2016; Turner & al., 2018). Consequently, one could postulate that changes in BMAT volume previously attributed to mechanical unloading may in truth be caused by alterations in energy balance and thermoregulation. It is interesting to note that serum Leptin levels were markedly reduced in HLU animals kept at 22°C, when compared to Control animals kept at 22°C and to HLU and Controls kept at 28°C (Fig.2H). This discrepancy further supports the effects of HLU and temperature combined, and again questions the validity of interpretations of changes to BMAT during HLU in standard laboratory conditions.

Correlations between BMAT volume and a number of variables (BV/TV, Tb.Th, Body weight, Losses in body weight during the 14-day HLU protocol) did not identify any significant trends (Fig.3B). This initial result suggests little to no effect of BMAT volume on bone losses during HLU, although given the nature of these measurements there is no way to know if the BMAT was present at the start of the HLU period or if it developed during the protocol, and temporally these analyses cannot identify if BMAT played a role on bone parameters during HLU or vice-versa. Therefore, further investigation into the role of BMAT on HLU-induced bone losses was undertaken with the fat-deplete BSCL2^{-/-} mice.

References

- Ahdjoudj, S., Lasmoles, F., Holy, X., Zerath, E. & Marie, P. J. Transforming growth factor beta2 inhibits adipocyte differentiation induced by skeletal unloading in rat bone marrow stroma. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* 17, 668–677 (2002).
- Amblard, D. et al. Tail suspension induces bone loss in skeletally mature mice in the C57BL/6J strain but not in the C3H/HeJ strain. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* 18, 561–569 (2003).
- Ambrosi, T. H., Longaker, M. T. & Chan, C. K. F. A Revised Perspective of Skeletal Stem Cell Biology. *Front. Cell Dev. Biol.* 7, (2019).
- Andreev-Andrievskiy, A. et al. Mice in Bion-M 1 Space Mission: Training and Selection. *PLoS ONE* 9, (2014).
- Baccin C, Al-Sabah J, Velten L, Helbling PM, Grünschläger F, Hernández-Malmierca P, Nombela-Arrieta C, Steinmetz LM, Trumpp A, Haas S. Combined single-cell and spatial transcriptomics reveal the molecular, cellular and spatial bone marrow niche organization. *Nat Cell Biol.* 2020 Jan;22(1):38-48. doi: 10.1038/s41556-019-0439-6. Epub 2019 Dec 23. PMID: 31871321.
- Baryawno N, Przybylski D, Kowalczyk MS & al. A Cellular Taxonomy of the Bone Marrow Stroma in Homeostasis and Leukemia. *Cell.* 2019 Jun 13;177(7):1915-1932.e16. doi: 10.1016/j.cell.2019.04.040. Epub 2019 May 23. PMID: 31130381; PMCID: PMC6570562.
- Bianco P, Robey PG. Skeletal stem cells. *Development.* 2015 Mar 15;142(6):1023-7. doi: 10.1242/dev.102210. PMID: 25758217; PMCID: PMC4360182.
- Bianco, P., Kuznetsov, S. A., Riminucci, M. & Gehron Robey, P. Postnatal skeletal stem cells. *Methods Enzymol.* 419, 117–148 (2006).
- Bianco, P., Robey, P. G. & Simmons, P. J. Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays. *Cell Stem Cell* 2, 313–319 (2008).
- Bredella MA, Torriani M, Ghomi RH, Thomas BJ, Brick DJ, Gerweck AV, Harrington LM, Breggia A, Rosen CJ, Miller KK. Determinants of bone mineral density in obese premenopausal women. *Bone.* 2011 Apr 1;48(4):748-54. doi: 10.1016/j.bone.2010.12.011. Epub 2010 Dec 30. PMID: 21195217; PMCID: PMC3073669.
- Bredella, M. A. et al. Vertebral bone marrow fat is positively associated with visceral fat and inversely associated with IGF-1 in obese women. *Obes. Silver Spring Md* 19, 49–53 (2011).
- Caire R, Roche B, Picot T, Aanei CM, He Z, Campos L, Thomas M, Malaval L, Vico L, Lafage-Proust MH. Parathyroid Hormone Remodels Bone Transitional Vessels and the Leptin Receptor-Positive Pericyte Network in Mice. *J Bone Miner Res.* 2019 Aug;34(8):1487-1501. doi: 10.1002/jbmr.3728. Epub 2019 May 17. PMID: 30920026.
- Cawthorn, W. P. et al. Bone marrow adipose tissue is an endocrine organ that contributes to increased circulating adiponectin during caloric restriction. *Cell Metab.* 20, 368–375 (2014).
- Cawthorn, W. P. et al. Expansion of Bone Marrow Adipose Tissue During Caloric Restriction Is Associated With Increased Circulating Glucocorticoids and Not With Hypoleptinemia. *Endocrinology* 157, 508–521 (2016).
- Chappard D, Palle S, Alexandre C, Vico L, Riffat G. Bone embedding in pure methyl methacrylate at low temperature preserves enzyme activities. *Acta Histochem.* 1987;81(2):183-90. doi: 10.1016/S0065-1281(87)80012-0. PMID: 3111154.
- Chevalier C, Kieser S, Çolakoğlu M, Hadadi N, Brun J, Rigo D, Suárez-Zamorano N, Spiljar M, Fabbiano S, Busse B, Ivanišević J, Macpherson A, Bonnet N, Trajkovski M. Warmth Prevents Bone Loss Through the Gut Microbiota. *Cell Metab.* 2020 Oct 6;32(4):575-590.e7. doi: 10.1016/j.cmet.2020.08.012. Epub 2020 Sep 10. PMID: 32916104; PMCID: PMC7116155.

- David, V. et al. Mechanical loading down-regulates peroxisome proliferator-activated receptor gamma in bone marrow stromal cells and favors osteoblastogenesis at the expense of adipogenesis. *Endocrinology* 148, 2553–2562 (2007).
- DEVLIN, M. et al. Daily leptin blunts marrow fat but does not impact bone mass in calorie restricted mice. *J. Endocrinol.* 229, 295–306 (2016).
- Devlin, M. J. Why does starvation make bones fat? *Am. J. Hum. Biol. Off. J. Hum. Biol. Counc.* 23, 577–585 (2011).
- Dollet, L., Magré, J., Cariou, B. & Prieur, X. Function of seipin: new insights from Bsc12/seipin knockout mouse models. *Biochimie* 96, 166–172 (2014).
- Ecklund, K. et al. Bone marrow changes in adolescent girls with anorexia nervosa. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* 25, 298–304 (2010).
- Ellman, R. et al. Combined effects of botulinum toxin injection and hind limb unloading on bone and muscle. *Calcif. Tissue Int.* 94, 327–337 (2014).
- Fan Y, Hanai JI, Le PT, Bi R, Maridas D, DeMambro V, Figueroa CA, Kir S, Zhou X, Mannstadt M, Baron R, Bronson RT, Horowitz MC, Wu JY, Bilezikian JP, Dempster DW, Rosen CJ, Lanske B. Parathyroid Hormone Directs Bone Marrow Mesenchymal Cell Fate. *Cell Metab.* 2017 Mar 7;25(3):661-672. doi: 10.1016/j.cmet.2017.01.001. Epub 2017 Feb 2. PMID: 28162969; PMCID: PMC5342925.
- Fazeli, P. K. et al. Marrow fat and preadipocyte factor-1 levels decrease with recovery in women with anorexia nervosa. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* 27, 1864–1871 (2012).
- Gao, Y. et al. Magnetic resonance imaging-measured bone marrow adipose tissue area is inversely related to cortical bone area in children and adolescents aged 5-18 years. *J. Clin. Densitom. Off. J. Int. Soc. Clin. Densitom.* 18, 203–208 (2015).
- Gerbaix, M. et al. One-month spaceflight compromises the bone microstructure, tissue-level mechanical properties, osteocyte survival and lacunae volume in mature mice skeletons. *Sci. Rep.* 7, 2659 (2017).
- Giles, D. A. et al. Thermoneutral housing exacerbates non-alcoholic fatty liver disease in mice and allows for sex-independent disease modeling. *Nat. Med.* 23, 829–838 (2017).
- Goto, H. et al. Primary human bone marrow adipocytes support TNF- α -induced osteoclast differentiation and function through RANKL expression. *Cytokine* 56, 662–668 (2011).
- Hamrick, M. W., Ding, K.-H., Ponnala, S., Ferrari, S. L. & Isales, C. M. Caloric restriction decreases cortical bone mass but spares trabecular bone in the mouse skeleton: implications for the regulation of bone mass by body weight. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* 23, 870–878 (2008).
- Hino, K. et al. Unloading-induced bone loss was suppressed in gold-thioglucose treated mice. *J. Cell. Biochem.* 99, 845–852 (2006).
- Iwaniec, U. T. & Turner, R. T. Failure to generate bone marrow adipocytes does not protect mice from ovariectomy-induced osteopenia. *Bone* 53, 145–153 (2013).
- Iwaniec, U. T. et al. Room temperature housing results in premature cancellous bone loss in growing female mice: implications for the mouse as a preclinical model for age-related bone loss. *Osteoporos. Int. J. Establ. Result Coop. Eur. Found. Osteoporos. Natl. Osteoporos. Found. USA* 27, 3091–3101 (2016).
- Kawao, N., Moritake, A., Tatsumi, K. & Kaji, H. Roles of Irisin in the Linkage from Muscle to Bone During Mechanical Unloading in Mice. *Calcif. Tissue Int.* 103, 24–34 (2018).
- Keune, J. A., Wong, C. P., Branscum, A. J., Iwaniec, U. T. & Turner, R. T. Bone Marrow Adipose Tissue Deficiency Increases Disuse-Induced Bone Loss in Male Mice. *Sci. Rep.* 7, 46325 (2017).

- L Newton A, J Hanks L, Davis M, Casazza K. The relationships among total body fat, bone mineral content and bone marrow adipose tissue in early-pubertal girls. *Bonekey Rep.* 2013 Apr 10;2:315. doi: 10.1038/bonekey.2013.49. PMID: 23951544; PMCID: PMC3722749.
- Lanotte, M., Metcalf, D. & Dexter, T. M. Production of monocyte/macrophage colony-stimulating factor by preadipocyte cell lines derived from murine marrow stroma. *J. Cell. Physiol.* 112, 123–127 (1982).
- Li, Z., Hardij, J., Bagchi, D. P., Scheller, E. L. & MacDougald, O. A. Development, regulation, metabolism and function of bone marrow adipose tissues. *Bone* 110, 134–140 (2018).
- Lin, C. et al. Sclerostin mediates bone response to mechanical unloading through antagonizing Wnt/beta-catenin signaling. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* 24, 1651–1661 (2009).
- Liu, L. et al. Adipose-specific knockout of SEIPIN/BSCL2 results in progressive lipodystrophy. *Diabetes* 63, 2320–2331 (2014).
- Liu, L.-F., Shen, W.-J., Zhang, Z. H., Wang, L. J. & Kraemer, F. B. Adipocytes decrease Runx2 expression in osteoblastic cells: roles of PPAR γ and adiponectin. *J. Cell. Physiol.* 225, 837–845 (2010).
- Martin, S. A. et al. Thermoneutral housing attenuates premature cancellous bone loss in male C57BL/6J mice. *Endocr. Connect.* 8, 1455–1467 (2019).
- McKie, G. L. et al. Housing temperature affects the acute and chronic metabolic adaptations to exercise in mice. *J. Physiol.* 597, 4581–4600 (2019).
- Morey, E. R. Spaceflight and Bone Turnover: Correlation with a New Rat Model of Weightlessness. *BioScience* 29, 168–172 (1979).
- Motyl KJ, Guntur AR, Carvalho AL, Rosen CJ. Energy Metabolism of Bone. *Toxicol Pathol.* 2017 Oct;45(7):887-893. doi: 10.1177/0192623317737065. Epub 2017 Nov 2. PMID: 29096593; PMCID: PMC5777524.
- 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.* 100, 3613–3621 (2015).
- Raun, S. H. et al. Housing temperature influences exercise training adaptations in mice. *Nat. Commun.* 11, 1560 (2020).
- Ricci, T. A. et al. Moderate energy restriction increases bone resorption in obese postmenopausal women. *Am. J. Clin. Nutr.* 73, 347–352 (2001).
- Scheller, E. L., Burr, A. A., MacDougald, O. A. & Cawthorn, W. P. Inside out: Bone marrow adipose tissue as a source of circulating adiponectin. *Adipocyte* 5, 251–269 (2016).
- Schellinger, D., Lin, C. S., Hatipoglu, H. G. & Fertikh, D. Potential value of vertebral proton MR spectroscopy in determining bone weakness. *AJNR Am. J. Neuroradiol.* 22, 1620–1627 (2001).
- Shahnazari, M. et al. Simulated spaceflight produces a rapid and sustained loss of osteoprogenitors and an acute but transitory rise of osteoclast precursors in two genetic strains of mice. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* 303, E1354–E1362 (2012).
- Shen W, Chen J, Gantz M, Punyanitya M, Heymsfield SB, Gallagher D, Albu J, Engelson E, Kotler D, Pi-Sunyer X, Gilsanz V. MRI-measured pelvic bone marrow adipose tissue is inversely related to DXA-measured bone mineral in younger and older adults. *Eur J Clin Nutr.* 2012 Sep;66(9):983-8. doi: 10.1038/ejen.2012.35. Epub 2012 Apr 11. PMID: 22491495; PMCID: PMC3396793.
- Shen, W. et al. Relationship between MRI-measured bone marrow adipose tissue and hip and spine bone mineral density in African-American and Caucasian participants: the CARDIA study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 97, 1337–1346 (2012).

- Simske, S. J., Guerra, K. M., Greenberg, A. R. & Luttges, M. W. The physical and mechanical effects of suspension-induced osteopenia on mouse long bones. *J. Biomech.* 25, 489–499 (1992).
- Small, L., Gong, H., Yassmin, C., Cooney, G. J. & Brandon, A. E. Thermoneutral housing does not influence fat mass or glucose homeostasis in C57BL/6 mice. *J. Endocrinol.* 239, 313–324 (2018).
- Spatz, J. M. et al. Sclerostin antibody inhibits skeletal deterioration due to reduced mechanical loading. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* 28, 865–874 (2013).
- Stemmer, K. et al. Thermoneutral housing is a critical factor for immune function and diet-induced obesity in C57BL/6 nude mice. *Int. J. Obes.* 2005 39, 791–797 (2015).
- Suchacki KJ, Roberts F, Lovdel A, Farquharson C, Morton NM, MacRae VE, Cawthorn WP. Skeletal energy homeostasis: a paradigm of endocrine discovery. *J Endocrinol.* 2017 Jul;234(1):R67-R79. doi: 10.1530/JOE-17-0147. Epub 2017 Apr 28. PMID: 28455432.
- Swift, J. M., Swift, S. N., Allen, M. R. & Bloomfield, S. A. Beta-1 adrenergic agonist treatment mitigates negative changes in cancellous bone microarchitecture and inhibits osteocyte apoptosis during disuse. *PLoS One* 9, e106904 (2014).
- Talbott, S. M., Rothkopf, M. M. & Shapses, S. A. Dietary restriction of energy and calcium alters bone turnover and density in younger and older female rats. *J. Nutr.* 128, 640–645 (1998).
- Tornvig, L., Mosekilde, L. I., Justesen, J., Falk, E. & Kassem, M. Troglitazone treatment increases bone marrow adipose tissue volume but does not affect trabecular bone volume in mice. *Calcif. Tissue Int.* 69, 46–50 (2001).
- Tosa I, Yamada D, Yasumatsu M, Hinoi E, Ono M, Oohashi T, Kuboki T, Takarada T. Postnatal Runx2 deletion leads to low bone mass and adipocyte accumulation in mice bone tissues. *Biochem Biophys Res Commun.* 2019 Sep 3;516(4):1229-1233. doi: 10.1016/j.bbrc.2019.07.014. Epub 2019 Jul 9. PMID: 31300199.
- Trayhurn, P. Thermoregulation in the diabetic-obese (db/db) mouse. The role of non-shivering thermogenesis in energy balance. *Pflugers Arch.* 380, 227–232 (1979).
- Turner, R. T. & Iwaniec, U. T. Low Dose Parathyroid Hormone Maintains Normal Bone Formation in Adult Male Rats During Rapid Weight Loss. *Bone* 48, 726–732 (2011).
- Turner, R. T. et al. Morbid obesity attenuates the skeletal abnormalities associated with leptin deficiency in mice. *J. Endocrinol.* 223, M1-15 (2014).
- Turner, R. T., Martin, S. A. & Iwaniec, U. T. Metabolic Coupling between Bone Marrow Adipose Tissue and Hematopoiesis. *Curr. Osteoporos. Rep.* 16, 95–104 (2018).
- Wan, Y., Chong, L.-W. & Evans, R. M. PPAR-gamma regulates osteoclastogenesis in mice. *Nat. Med.* 13, 1496–1503 (2007).
- Wehrli, F. W. et al. Cross-sectional study of osteopenia with quantitative MR imaging and bone densitometry. *Radiology* 217, 527–538 (2000).
- Xiao L, Sobue T, Esliger A, Kronenberg MS, Coffin JD, Doetschman T, Hurley MM. Disruption of the Fgf2 gene activates the adipogenic and suppresses the osteogenic program in mesenchymal marrow stromal stem cells. *Bone.* 2010 Aug;47(2):360-70. doi: 10.1016/j.bone.2010.05.021. Epub 2010 May 25. PMID: 20510392; PMCID: PMC2947437.
- Zhong L, Yao L, Tower RJ, Wei Y, Miao Z, Park J, Shrestha R, Wang L, Yu W, Holdreith N, Huang X, Zhang Y, Tong W, Gong Y, Ahn J, Susztak K, Dymant N, Li M, Long F, Chen C, Seale P, Qin L. Single cell transcriptomics identifies a unique adipose lineage cell population that regulates bone marrow environment. *Elife.* 2020 Apr 14;9:e54695. doi: 10.7554/eLife.54695. PMID: 32286228; PMCID: PMC7220380.

Conclusions et perspectives

A travers cette thèse, nous avons tout d'abord eu l'occasion d'améliorer le modèle HLU par rapport aux études précédentes en contrôlant plusieurs effets confondants dans l'expérimentation animale. Des protocoles HLU de 5 et 14 jours nous ont permis d'étudier la cinétique dans la variation des paramètres architecturaux osseux, les activités cellulaires et le comportement ostéocytaire. Des analyses approfondies par RT-qPCR et imageries ostéocytaires nous ont permis de se concentrer sur le rôle des ostéocytes dans la perte osseuse d'immobilisation. Cette thèse a également permis de découvrir un rôle primordial de la température d'hébergement sur la physiologie et la perte osseuse d'immobilisation chez les souris, et constitue un apport essentiel à la communauté scientifique.

Validation du modèle HLU

Nous avons apporté de nombreuses améliorations afin d'augmenter la robustesse du modèle HLU. Tout d'abord, une période d'acclimatation prolongée de 4 semaines précédant le début du protocole permet de s'assurer de l'adaptation des souris à leur nouvel environnement, qui présente de nombreuses modifications par rapport à leur hébergement précédent : isolement, cage spécifique à la suspension, pas d'accès à la litière, et une nouvelle température environnante (28°C). Un intérêt particulier a été porté pour minimiser au maximum les différences de conditions expérimentales entre les souris contrôles et suspendues. De ce fait, les souris contrôles ont été logées de manière identique aux souris suspendues. Bien que des études ont démontré que l'effet du stress thermique de la température d'hébergement entre des souris groupées et des souris isolées était minime (Maher et al. 2015; Christopher J. Gordon 2017), le stress de l'isolement social n'est pas négligeable et pourrait influencer certains paramètres physiologiques. De plus, l'isolement des souris contrôles permet également de suivre la consommation alimentaire de manière individuelle et d'effectuer un *pair-feeding* avec les souris suspendues. Or, la consommation alimentaire a une influence sur la BMAT et les paramètres osseux (Doucette et al. 2015; Tencerova et al. 2018; Devlin 2011; Hamrick et al. 2008). Il est donc important de normaliser ces paramètres entre souris contrôles et suspendues afin d'éviter un effet cofondant dû à une consommation alimentaire qui aura tendance à être plus élevée chez les souris contrôles.

Afin de vérifier l'influence de nos conditions expérimentales, notamment l'isolement social et le *pair-feeding*, un protocole de 6 semaines (correspondant à la période d'acclimatation de 4 semaines suivie de deux semaines de protocole) a été effectué avec des souris contrôles logées 2 par 2 et un accès à la nourriture *ad libitum*, à une température d'hébergement de 28°C. L'analyse des différents paramètres chez ces souris « standards » a démontré une consommation alimentaire légèrement inférieure ainsi que des paramètres trabéculaires plus élevés et des niveaux d'expression plus faibles de RANKL, SOST, M-

CSF et OPG, comparées au groupe CONT isolé et pair-fed. Cette expérimentation confirme l'importance d'une acclimatation adéquate ainsi que des conditions expérimentales identiques pour les CONT et HLU.

La principale mise au point expérimentale pour améliorer la robustesse du modèle HLU est bien-sûr la température d'hébergement thermoneutre de 28°C. Les effets systémiques et locaux de la température environnante seront discutés plus loin dans ce chapitre.

L'ensemble des modifications effectuées pour l'expérimentation HLU au sein de cette thèse a permis d'identifier et d'éliminer plusieurs effets confondants dans ce modèle, et ainsi d'améliorer le modèle afin de pouvoir analyser le seul effet de la décharge mécanique.

Evolution des paramètres architecturaux et des activités cellulaires

Brièvement, nous avons identifié que l'HLU induisait une perte osseuse significative trabéculaire et corticale dans le fémur et le tibia. La perte osseuse trabéculaire est visible dès 5 jours de suspension, alors que la perte osseuse corticale est visible seulement à partir de 14 jours. L'analyse de différentes ROIs du fémur et du tibia pour les paramètres corticaux a permis d'observer des réponses site-spécifiques à la décharge mécanique et à la température. Nos résultats suggèrent également un plateau de perte osseuse trabéculaire, malgré des valeurs pre-HLU très variables entre les différentes souris et groupes. En effet, ce même plateau a été observé chez les souris âgées (40 semaines). Indépendamment de l'âge et de la température d'hébergement, le méchanostat semble donc atteindre donc un nouvel équilibre physiologique en 14 jours dans le compartiment trabéculaire. Un plateau de perte osseuse corticale n'a pas été observée dans cette étude après 14 jours d'HLU. Une période de suspension plus longue, de 3 à 4 semaines, permettrait de confirmer l'existence d'un plateau de perte osseuse trabéculaire et corticale.

Dans les deux compartiments, la perte osseuse chez les souris suspendues est associée à une augmentation de la résorption ostéoclastique dont le pic d'activité se situe à 5 jours, sans variation de l'activité de formation osseuse. La perte osseuse trabéculaire est associée à une diminution de l'épaisseur trabéculaire sans variation du nombre de trabécules. Dans le compartiment cortical, la perte osseuse est associée à une diminution de l'épaisseur corticale sans variation de l'aire médullaire, suggérant une résorption périostée. Il est dommage que des analyses histomorphométriques de la surface ostéoclastique endocorticale ou périostée n'aient pu être effectuées. Ce paramètre n'a jamais été analysé au sein des études HLU, ou alors qu'au niveau de la surface endocorticale (Farley et al. 2020) En effet, cette analyse serait faussée par le fait que la surface périostée peut être légèrement dégradée lors de la dissection ou du traitement de l'échantillon osseux. L'étude de Cabahug-Zuckerman analyse le taux de surface osseuse érodée, mais ne révèle cependant pas l'activité ostéoclastique à un temps t. A défaut, L'analyse

des taux d'expressions de marqueurs ostéoclastiques tels que *Ctsk*, *Trap*, *RankL* et *Mcsf* par RT-qPCR sur le compartiment cortical a permis d'évaluer l'expression des marqueurs agissant sur l'activité de résorption osseuse.

Rôle des ostéocytes dans la perte osseuse d'immobilisation

Signalisation ostéocytaire

Les études HLU sur les variations des molécules ostéocytaires telles que RANKL et SOST ont toutes effectuées des analyses par marquages immunohistochimiques sur des sections histologiques (Cabahug-Zuckerman et al. 2016; Plotkin 2014; Metzger et al. 2017). Or les photographies présentées de ces immunomarquages restent peu convaincantes. De notre propre expérience, les immunomarquages de molécules solubles tels que RANKL et SOST au niveau du cortex ne fournissent pas un résultat assez fiable pour être analysé. Les différentes molécules ostéocytaires ont donc été évaluées par RT-qPCR. Pour cela, la séparation du compartiment cortical du compartiment médullaire a été effectuée afin de pouvoir obtenir un échantillon enrichi en ostéocytes. Cependant, cet échantillon contient également en moindre mesure des ostéoclastes, des ostéoblastes et des cellules endothéliales.

A thermoneutralité, et en contradiction avec la littérature existante (Cabahug-Zuckerman et al. 2016; Plotkin 2014; Metzger et al. 2017), aucune variation dans l'expression de RANKL, SOST, et OPG n'a été observée chez les souris suspendues comparées aux CONT. A température standard, nous avons retrouvé une élévation de l'expression de RANKL à 5 jours, qui corrobore cette fois-ci les études antérieures. Ces résultats mettent en évidence pour la première fois dans le modèle HLU, une augmentation de la résorption ainsi qu'une perte osseuse sans signalisation ostéocytaire apparente. En absence d'un rôle de molécules ostéocytaires dans la perte osseuse d'immobilisation à thermoneutralité, le mécanisme de perte osseuse reste à être identifié.

Nos analyses des molécules ostéocytaires étant uniquement basées sur les niveaux d'expression géniques, il serait intéressant d'effectuer des analyses Western-Blot afin de pouvoir quantifier les taux protéiques respectifs. Afin de confirmer une absence de signalisation ostéocytaire à thermoneutralité, un protocole avec différentes périodes de suspension plus rapprochées dans le temps (1jour, 3 jours, 5 jours et 7 jours) pourrait possiblement révéler des élévations transitoires de certains marqueurs ostéocytaires.

Mort ostéocytaire

A travers cette thèse, nous avons développé plusieurs techniques afin d'analyser le comportement ostéocytaire en profondeur. Contrairement aux études HLU existantes, la densité ostéocytaire ainsi que les lacunes vides ont été analysés dans un volume 3D grâce à la transparisation et un marquage DAPI dans un ring transversal du cortex fémoral. De plus, les niveaux d'expression génique de marqueurs autophagiques, apoptotiques et de sénescence ont été évalués par RT-qPCR. Les différentes analyses effectuées n'ont révélé aucun signe de mort ostéocytaire chez les souris suspendues, que ce soit à 22°C ou à 28°C. Cette étude a démontré que la perte osseuse d'immobilisation ainsi que l'augmentation de la résorption pouvaient avoir lieu sans aucune mort ostéocytaire, remettant en question les hypothèses avancées dans la littérature existante. Cependant, il n'est pas exclu que des périodes de suspension plus longues puissent induire une mort ostéocytaire. Ces travaux ont également mis en lumière l'importance des techniques d'analyses pour évaluer la mort ostéocytaire en évitant de possibles artefacts techniques dû aux sections histologiques trop fines ou au traitement des échantillons.

Réseau ostéocytaire et lacuno-canaliculaire

Afin d'approfondir le rôle des ostéocytes dans la perte osseuse d'immobilisation, des analyses structurales du réseau ostéocytaire (corps cellulaires et dendrites) ainsi que du réseau lacuno-canaliculaire (lacunes et canalicules) ont été effectuées. Pour cela il a été mis au point un protocole de multimarquage inspiré de l'équipe de Sarah Dallas, avec un marquage des membranes ostéocytaires au DIL et une révélation des espaces fluidiques (lacunes et canalicules) par la perméabilisation de la fluorescéine. Puisque notre matériel informatique ne permettait pas d'effectuer des analyses 3D de ces images, plusieurs images 2D ont été effectuées dans une profondeur corticale de 50µm pour chaque souris. Le choix d'une analyse sériée en 2D a également permis d'analyser une aire importante du réseau ostéocytaire. En effet, devant le défi technique et matériel qu'elles représentent, les études ayant effectué des analyses 3D se restreignent à l'évaluation de seulement quelques ostéocytes, et risquent de rapporter des résultats qui ne sont pas représentatifs. Devant le grand nombre d'images, nos analyses sériées 2D n'auraient pu être effectuées sans le travail de programmation Macros Image J permettant de segmenter et analyser automatiquement les images du réseau ostéocytaire et lacuno-canaliculaire.

A ce jour, nous pensons avoir effectué la première étude HLU qui étudie à la fois le réseau ostéocytaire et lacuno-canaliculaire. Nous avons mis en évidence à 22°C, une altération dans la connectivité dendritique ainsi que dans la connectivité canaliculaire. Cette altération pourrait être expliquée par une dégradation des jonctions dendritiques, notamment de la connexine 43, dont le taux d'expression est en cours d'étude. Elle pourrait également être expliquée par un remodelage intracortical, mais qui reste peu probable chez des souris jeunes, (peu probable chez ces souris encore jeunes et dont tu ne vois pas de porosité augmenter) ou un remodelage péri-lacuno-canaliculaire. Afin de pouvoir identifier ces

derniers phénomènes, une imagerie brightfield superposée à l'imagerie DIL et Fluorescéine pourrait tout d'abord permettre d'observer de possibles corrélations entre la structure osseuse intra-corticale et les espacements observés dans les réseaux. Une éventuelle réduction du diamètre des canalicules pourrait également être évaluée par des analyses nano-CT avec une résolution de l'ordre de 50 nm. L'altération de la connectivité des réseaux pourraient augmenter le stress au niveau des ostéocytes dont les nutriments et les déchets ne pourraient alors plus être transportés via le liquide interstitiel. Afin de confirmer cette hypothèse, une analyse des marqueurs d'hypoxie, de stress oxydatif, et d'inflammation sont en cours d'étude.

Aucune altération du réseau ostéocytaire ou lacuno-canaliculaire n'a été mise en évidence chez les souris suspendues à 28°C. Cependant, la cinétique de perte osseuse corticale semblant être plus lente que celle à 22°C, des altérations similaires pourraient être observées avec un temps de suspension plus long de 3 à 4 semaines. On peut également penser qu'une analyse 3D ainsi qu'une analyse plus précise par ostéocyte, auraient pu révéler à 28°C certaines modifications structurelles qui ne peuvent être observées avec des analyses 2D, comme par exemple l'orientation spatiale des dendrites.

A 22°C, l'augmentation des gènes impliqués dans le remodelage péri-lacuno-canaliculaire (*Ctsk*, *Trap*, *Mmp13*) ainsi que l'altération dans la connectivité du réseau ostéocytaire et lacuno-canaliculaire, pourraient expliquer en partie l'augmentation de la résorption osseuse et la perte osseuse subséquente chez les souris suspendues. Cependant, aucune de ces observations n'a été faite à thermoneutralité, et remet drastiquement en question le rôle des ostéocytes dans la perte osseuse d'immobilisation. Les causes et mécanismes biologiques menant à la résorption et à la perte osseuse restent à être identifiés, mais ne peuvent être entièrement imputés aux ostéocytes, comme les précédentes études le suggérait.

A ce jour, nous ne savons pas si les altérations du réseau ostéocytaire sont réversibles ou non. Dans ce contexte, il serait intéressant d'effectuer un protocole de suspension suivi d'une période de récupération, afin de pouvoir observer si le réseau ostéocytaire se rétablit/s'étend de nouveau en présence d'une charge mécanique.

Rôle de la température d'hébergement.

Influence systémique

Nous avons démontré qu'une température d'hébergement standard a une influence significative sur la physiologie des souris. A 22°C, les souris mangent plus et pèsent moins que les souris à 28°C, indiquant une dépense énergétique supérieure, que nous avons en effet montré par le suivi de la consommation d'oxygène. La diminution du poids corporel chez ces souris est probablement associée à une diminution de la masse grasseuse. Il aurait été intéressant d'évaluer le taux de tissu adipeux par

évaluation DEXA. On peut également suggérer, qu'une partie du tissu adipeux blanc chez les souris à 22°C à subir une transformation en tissu adipeux brun pour favoriser la thermogénèse face au stress thermique. Une évaluation par RT-qPCR du gène UCP-1 au niveau du tissu graisseux pourrait être intéressante pour évaluer cette activité de thermogénèse, en plus de la pesée du tissu adipeux blanc et brun lors de la dissection.

Face à une dépense énergétique supérieure ainsi qu'une consommation en oxygène plus élevée, nous suggérons que les souris à 22°C présentent un métabolisme basal plus élevé qu'à thermoneutralité. Afin de confirmer cette hypothèse, une quantification du métabolisme basal via un système de mesure calorimétrique pourrait être effectuée. Afin de confirmer le stress thermique, une imagerie thermique haute résolution de la surface corporelle des souris pourrait être effectuée. Du fait de la suspension, il serait d'autant plus intéressant de pouvoir également mesurer ou imager la température au niveau des membres inférieurs, dont le stress thermique pourrait être accentué par le déplacement du flux sanguin vers la partie antérieure de la souris.

Influence sur l'homéostasie osseuse et la perte osseuse d'immobilisation

Dans notre étude, nous avons démontré qu'une température d'hébergement standard dégradait chez les souris contrôles les paramètres osseux trabéculaires et corticaux, et augmentait l'activité de résorption. Chez les souris suspendues, la température de 22°C accélère la perte osseuse trabéculaire et possiblement la perte osseuse corticale, associées à une augmentation de l'activité de résorption comparé à une température de 28°C. Bien que les souris à 22°C n'ont présenté aucune différence au niveau de la densité ostéocytaire et des lacunes vides, les marqueurs d'apoptose, d'autophagie et de sénescence présentent une tendance à être plus élevés chez ces souris comparées à 28°C, indépendamment de la condition mécanique. Ces résultats peuvent suggérer un stress ostéocytaire plus élevé dû au stress thermique. D'ailleurs, seules les souris 22°C présentent une altération drastique de la connectivité dans le réseau ostéocytaire et lacuno-canaliculaire suite à 14 jours de suspension.

Il serait également intéressant d'observer dans le futur les effets de la température d'hébergement sur la récupération des paramètres osseux suite à une période de suspension.

Rôle de la BMAT et de la vascularisation dans la perte osseuse

Ce travail de thèse ayant été en collaboration avec celui de Carmelo Mastrandrea, le rôle de la BMAT et de la vascularisation dans la perte osseuse d'immobilisation ont également pu être étudiés. A thermoneutralité, la suspension n'est pas associée à une augmentation de la BMAT au niveau de la

métaphyse tibiale ou fémorale. Cependant, à 22°C, en accord avec les études antécédentes, la suspension est associée à une tendance à l'augmentation de la BMAT. De plus les expérimentations HLU chez les souris KO Seipin -/- ont démontré une variation des paramètres osseux similaires aux souris WT. Ces résultats confirment qu'à thermoneutralité, la BMAT n'a pas d'influence sur la perte osseuse d'immobilisation et que l'HLU n'induit pas une expansion médullaire. Cependant, il pourrait être tout d'abord intéressant de confirmer ces résultats en analysant différentes ROIs au niveau du fémur et du tibia, qui pourraient révéler des réponses site-spécifiques. La mesure du nombre d'adipocytes ainsi que de leur volume pourraient également fournir des informations permettant d'améliorer la compréhension du rôle de la BMAT dans le modèle HLU.

L'effet de l'HLU sur la vascularisation médullaire a été analysé chez les souris à 28°C. Les analyses immunohistochimiques et de cytométrie en flux du réseau vasculaire transitionnel n'ont présenté aucune variation entre les souris contrôles et suspendues. Ces résultats rejettent l'hypothèse que l'HLU influence la niche hématopoïétique et ostéoprogénitrice, et confirme une activité de formation osseuse inchangée.

Transposition chez l'humain

La compréhension des mécanismes de la perte osseuse d'immobilisation ainsi que du rôle des ostéocytes nécessitent encore de nombreuses études avant de pouvoir apporter des connaissances scientifiques bénéfiques à la problématique des astronautes. Les humains, et notamment les astronautes, en tant que bons homéothermes, ne sont pas exposés à un stress thermique, comme c'est le cas pour les souris à 22°C. Cependant, le stress thermique chez les souris ne pourrait être qu'un facteur parmi d'autres pouvant induire une dépense énergétique plus élevée, un métabolisme basal plus élevé, voir une modification du métabolisme énergétique. D'ailleurs, des études ont démontré une association entre la décharge mécanique et des perturbations du métabolisme énergétique telles que l'apparition d'une insulino-résistance et la favorisation du métabolisme oxydatif au dépend du métabolisme glycolytique dans les muscles (Linossier et al. 2017; Momken et al. 2011). Chez les astronautes, on peut penser que le métabolisme énergétique subit une modification de manière à favoriser certains processus biologique, organe, ou système physiologique, afin de s'adapter à la microgravité, et ceci au détriment du système squelettique. L'étude des interactions entre le métabolisme énergétique et l'os semble prometteuse afin d'avancer dans la compréhension de la perte osseuse induite par la décharge mécanique.

Bibliographie

- Aguirre, J Ignacio, Lilian I Plotkin, Scott A Stewart, Robert S Weinstein, A Michael Parfitt, Stavros C Manolagas, et Teresita Bellido. 2006. « Osteocyte Apoptosis Is Induced by Weightlessness in Mice and Precedes Osteoclast Recruitment and Bone Loss ». *Journal of Bone and Mineral Research* 21 (4): 605- 15. <https://doi.org/10.1359/jbmr.060107>.
- Ahdjoudj, Souhila, Françoise Lasmoles, Xavier Holy, Erik Zerath, et Pierre J. Marie. 2002. « Transforming Growth Factor B2 Inhibits Adipocyte Differentiation Induced by Skeletal Unloading in Rat Bone Marrow Stroma ». *Journal of Bone and Mineral Research* 17 (4): 668- 77. <https://doi.org/10.1359/jbmr.2002.17.4.668>.
- Ajubi, N. E., J. Klein-Nulend, P. J. Nijweide, T. Vrijheid-Lammers, M. J. Alblas, et E. H. Burger. 1996. « Pulsating fluid flow increases prostaglandin production by cultured chicken osteocytes—a cytoskeleton-dependent process ». *Biochemical and biophysical research communications* 225 (1): 62- 68.
- Alford, A. I, C. R Jacobs, et H. J Donahue. 2003. « Oscillating fluid flow regulates gap junction communication in osteocytic MLO-Y4 cells by an ERK1/2 MAP kinase-dependent mechanism☆ ». *Bone* 33 (1): 64- 70. [https://doi.org/10.1016/S8756-3282\(03\)00167-4](https://doi.org/10.1016/S8756-3282(03)00167-4).
- Amblard, Daniel, Marie-Hélène Lafage-Proust, Annette Chamson, Aline Rattner, Philippe Collet, Christian Alexandre, et Laurence Vico. 2003. « Lower Bone Cellular Activities in Male and Female Mature C3H/HeJ Mice Are Associated with Higher Bone Mass and Different Pyridinium Crosslink Profiles Compared to C57BL/6J Mice ». *Journal of Bone and Mineral Metabolism* 21 (6): 377- 87. <https://doi.org/10.1007/s00774-003-0432-8>.
- Bach-Gansmo, Fiona Linnea, Nina Kølln Wittig, Annemarie Brüel, Jesper Skovhus Thomsen, et Henrik Birkedal. 2016. « Immobilization and Long-Term Recovery Results in Large Changes in Bone Structure and Strength but No Corresponding Alterations of Osteocyte Lacunar Properties ». *Bone* 91 (octobre): 139- 47. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2016.07.005>.
- Bakker, Astrid D., Kazuhisa Soejima, Jenneke Klein-Nulend, et Elisabeth H. Burger. 2001. « The Production of Nitric Oxide and Prostaglandin E2 by Primary Bone Cells Is Shear Stress Dependent ». *Journal of Biomechanics* 34 (5): 671- 77. [https://doi.org/10.1016/S0021-9290\(00\)00231-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9290(00)00231-1).
- Bass, S. L., L. Saxon, R. M. Daly, C. H. Turner, A. G. Robling, E. Seeman, et S. Stuckey. 2002. « The Effect of Mechanical Loading on the Size and Shape of Bone in Pre-, Peri-, and Postpubertal Girls: A Study in Tennis Players ». *Journal of Bone and Mineral Research* 17 (12): 2274- 80. <https://doi.org/10.1359/jbmr.2002.17.12.2274>.
- Basso, Nick, et Johan N.M. Heersche. 2006. « Effects of Hind Limb Unloading and Reloading on Nitric Oxide Synthase Expression and Apoptosis of Osteocytes and Chondrocytes ». *Bone* 39 (4): 807- 14. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2006.04.014>.
- Basso, Nick, Yongheng Jia, Carl G. Bellows, et Johan N. M. Heersche. 2005. « The effect of reloading on bone volume, osteoblast number, and osteoprogenitor characteristics: Studies in hind limb unloaded rats ». *Bone* 37 (3): 370- 78. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2005.04.033>.
- Batra, Nidhi, Sirisha Burra, Arlene J. Siller-Jackson, Sumin Gu, Xuechun Xia, Gregory F. Weber, Douglas DeSimone, et al. 2012. « Mechanical stress-activated integrin $\alpha 5\beta 1$ induces opening of connexin 43 hemichannels ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (9): 3359- 64. <https://doi.org/10.1073/pnas.1115967109>.
- Beamer, W. G., L. R. Donahue, C. J. Rosen, et D. J. Baylink. 1996. « Genetic variability in adult bone density among inbred strains of mice ». *Bone* 18 (5): 397- 403. [https://doi.org/10.1016/8756-3282\(96\)00047-6](https://doi.org/10.1016/8756-3282(96)00047-6).

- Bellido, Teresita. 2014. « Osteocyte-Driven Bone Remodeling ». *Calcified tissue international* 94 (1): 25- 34. <https://doi.org/10.1007/s00223-013-9774-y>.
- Benayahu, D., I. Shur, et S. Ben-Eliyahu. 2000. « Hormonal Changes Affect the Bone and Bone Marrow Cells in a Rat Model ». *Journal of Cellular Biochemistry* 79 (3): 407- 15. [https://doi.org/10.1002/1097-4644\(20001201\)79:3<407::aid-jcb60>3.0.co;2-8](https://doi.org/10.1002/1097-4644(20001201)79:3<407::aid-jcb60>3.0.co;2-8).
- Berg-Johansen, Britta, Ellen C. Liebenberg, Alfred Li, Brandon R. Macias, Alan R. Hargens, et Jeffrey C. Lotz. 2016. « Spaceflight-Induced Bone Loss Alters Failure Mode and Reduces Bending Strength in Murine Spinal Segments: SPACEFLIGHT REDUCES SPINE BENDING STRENGTH ». *Journal of Orthopaedic Research* 34 (1): 48- 57. <https://doi.org/10.1002/jor.23029>.
- Blaber, Elizabeth A., Natalya Dvorochkin, Chialing Lee, Joshua S. Alwood, Rukhsana Yousuf, Piero Pianetta, Ruth K. Globus, Brendan P. Burns, et Eduardo A. C. Almeida. 2013. « Microgravity Induces Pelvic Bone Loss through Osteoclastic Activity, Osteocytic Osteolysis, and Osteoblastic Cell Cycle Inhibition by CDKN1a/P21 ». Édité par Jean-Marc Vanacker. *PLoS ONE* 8 (4): e61372. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061372>.
- Blanc, Stéphane, Sylvie Normand, Christiane Pachiaudi, Jacques-Olivier Fortrat, Martine Laville, et Claude Gharib. 2000. « Fuel Homeostasis during Physical Inactivity Induced by Bed Rest ». *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 85 (6): 2223- 33. <https://doi.org/10.1210/jcem.85.6.6617>.
- Bonewald, Lynda F. 2011. « The Amazing Osteocyte ». *Journal of Bone and Mineral Research* 26 (2): 229- 38. <https://doi.org/10.1002/jbmr.320>.
- Bonivtch, Amber Rath, Lynda F. Bonewald, et Daniel P. Nicoletta. 2007. « Tissue strain amplification at the osteocyte lacuna: A microstructural finite element analysis ». *Journal of biomechanics* 40 (10): 2199- 2206. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2006.10.040>.
- Bredella, Miriam A., Pouneh K. Fazeli, Karen K. Miller, Madhusmita Misra, Martin Torriani, Bijoy J. Thomas, Reza Hosseini Ghomi, Clifford J. Rosen, et Anne Klibanski. 2009. « Increased Bone Marrow Fat in Anorexia Nervosa ». *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 94 (6): 2129- 36. <https://doi.org/10.1210/jc.2008-2532>.
- Buenzli, Pascal R., et Natalie A. Sims. 2015. « Quantifying the Osteocyte Network in the Human Skeleton ». *Bone* 75 (juin): 144- 50. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2015.02.016>.
- Burger, E. H., et J. Klein-Nulend. 1999. « Mechanotransduction in Bone--Role of the Lacuno-Canalicular Network ». *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 13 Suppl: S101-112.
- Burghardt, Andrew J, Galateia J Kazakia, Miki Sode, Anne E de Papp, Thomas M Link, et Sharmila Majumdar. 2010. « A Longitudinal HR-pQCT Study of Alendronate Treatment in Postmenopausal Women With Low Bone Density: Relations Among Density, Cortical and Trabecular Microarchitecture, Biomechanics, and Bone Turnover ». *Journal of Bone and Mineral Research* 25 (12): 2558- 71. <https://doi.org/10.1002/jbmr.157>.
- Cabahug-Zuckerman, Pamela, Dorra Frikha-Benayed, Robert J Majeska, Alyssa Tuthill, Shoshana Yakar, Stefan Judex, et Mitchell B Schaffler. 2016. « Osteocyte Apoptosis Caused by Hindlimb Unloading is Required to Trigger Osteocyte RANKL Production and Subsequent Resorption of Cortical and Trabecular Bone in Mice Femurs ». *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 31 (7): 1356- 65. <https://doi.org/10.1002/jbmr.2807>.
- Caillot-Augusseau, Anne, Marie-Hélène Lafage-Proust, Claude Soler, Josiane Pernod, Francis Dubois, et Christian Alexandre. 1998. « Bone Formation and Resorption Biological Markers in Cosmonauts during and after a 180-Day Space Flight (Euromir 95) ». *Clinical Chemistry* 44 (3): 578- 85. <https://doi.org/10.1093/clinchem/44.3.578>.

- Caillot-Augusseau, Anne, Laurence Vico, Martina Heer, Dimitri Voroviev, Jean-Claude Souberbielle, Armin Zitterman, Christian Alexandre, et Marie-Hélène Lafage-Proust. 2000. « Space Flight Is Associated with Rapid Decreases of Undercarboxylated Osteocalcin and Increases of Markers of Bone Resorption without Changes in Their Circadian Variation: Observations in Two Cosmonauts ». *Clinical Chemistry* 46 (8): 1136- 43. <https://doi.org/10.1093/clinchem/46.8.1136>.
- Cardoso, Luis, Brad C Herman, Olivier Verborgt, Damien Laudier, Robert J Majeska, et Mitchell B Schaffler. 2009. « Osteocyte Apoptosis Controls Activation of Intracortical Resorption in Response to Bone Fatigue ». *Journal of Bone and Mineral Research* 24 (4): 597- 605. <https://doi.org/10.1359/JBMR.081210>.
- Cawthorn, William P., Erica L. Scheller, Sebastian D. Parlee, H. An Pham, Brian S. Learman, Catherine M. H. Redshaw, Richard J. Sulston, et al. 2016. « Expansion of Bone Marrow Adipose Tissue During Caloric Restriction Is Associated With Increased Circulating Glucocorticoids and Not With Hypoleptinemia ». *Endocrinology* 157 (2): 508- 21. <https://doi.org/10.1210/en.2015-1477>.
- Chevalier, Claire, Silas Kieser, Melis Çolakoğlu, Noushin Hadadi, Julia Brun, Dorothee Rigo, Nicolas Suárez-Zamorano, et al. 2020. « Warmth Prevents Bone Loss Through the Gut Microbiota ». *Cell Metabolism*, septembre, S1550413120304253. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2020.08.012>.
- Ciani, Cesare, Stephen B. Doty, et Susannah P. Fritton. 2009. « An Effective Histological Staining Process to Visualize Bone Interstitial Fluid Space Using Confocal Microscopy ». *Bone* 44 (5): 1015- 17. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2009.01.376>.
- Cohen, Adi, David W. Dempster, Emily M. Stein, Thomas L. Nickolas, Hua Zhou, Donald J. McMahon, Ralph Müller, et al. 2012. « Increased Marrow Adiposity in Premenopausal Women with Idiopathic Osteoporosis ». *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 97 (8): 2782- 91. <https://doi.org/10.1210/jc.2012-1477>.
- Collet, Ph., D. Uebelhart, L. Vico, L. Moro, D. Hartmann, M. Roth, et C. Alexandre. 1997. « Effects of 1- and 6-Month Spaceflight on Bone Mass and Biochemistry in Two Humans ». *Bone* 20 (6): 547- 51. [https://doi.org/10.1016/S8756-3282\(97\)00052-5](https://doi.org/10.1016/S8756-3282(97)00052-5).
- Cowin, S. C., L. Moss-Salentijn, et M. L. Moss. 1991. « Candidates for the Mechanosensory System in Bone ». *Journal of Biomechanical Engineering* 113 (2): 191- 97. <https://doi.org/10.1115/1.2891234>.
- Dallas, Sarah L., et David S. Moore. 2020. « Using Confocal Imaging Approaches to Understand the Structure and Function of Osteocytes and the Lacunocanalicular Network ». *Bone* 138 (septembre): 115463. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2020.115463>.
- David, John M., Arion F. Chatziioannou, Richard Taschereau, Hongkai Wang, et David B. Stout. 2013. « The Hidden Cost of Housing Practices: Using Noninvasive Imaging to Quantify the Metabolic Demands of Chronic Cold Stress of Laboratory Mice ». *Comparative Medicine* 63 (5): 386- 91.
- David, Valentin, Aline Martin, Marie-Hélène Lafage-Proust, Luc Malaval, Sylvie Peyroche, David B. Jones, Laurence Vico, et Alain Guignandon. 2007. « Mechanical Loading Down-Regulates Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ in Bone Marrow Stromal Cells and Favors Osteoblastogenesis at the Expense of Adipogenesis ». *Endocrinology* 148 (5): 2553- 62. <https://doi.org/10.1210/en.2006-1704>.
- Davis, Hannah M., Mohammad W. Aref, Alexandra Aguilar-Perez, Rafael Pacheco-Costa, Kimberly Allen, Sinai Valdez, Carmen Herrera, et al. 2018. « Cx43 overexpression in osteocytes prevents osteocyte apoptosis and preserves cortical bone quality in aging mice ». *JBMR plus* 2 (4): 206- 16. <https://doi.org/10.1002/jbm4.10035>.
- Davis, Hannah M., Rafael Pacheco-Costa, Emily G. Atkinson, Lucas R. Brun, Arancha R. Gortazar, Julia Harris, Masahiro Hiasa, et al. 2017. « Disruption of the Cx43/MiR21 Pathway Leads to

- Osteocyte Apoptosis and Increased Osteoclastogenesis with Aging ». *Aging Cell* 16 (3): 551- 63. <https://doi.org/10.1111/accel.12586>.
- Devlin, Maureen J. 2011. « Why Does Starvation Make Bones Fat? » *American Journal of Human Biology* 23 (5): 577- 85. <https://doi.org/10.1002/ajhb.21202>.
- Dodd, J. S., J. A. Raleigh, et T. S. Gross. 1999. « Osteocyte Hypoxia: A Novel Mechanotransduction Pathway ». *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 277 (3): C598- 602. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1999.277.3.C598>.
- Dole, Neha S., Courtney M. Mazur, Claire Acevedo, Justin P. Lopez, David A. Monteiro, Tristan W. Fowler, Bernd Gludovatz, et al. 2017. « Osteocyte intrinsic TGF β signaling regulates bone quality through perilacunar/canalicular remodeling ». *Cell reports* 21 (9): 2585- 96. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.10.115>.
- Doucette, Casey R., Mark C. Horowitz, Ryan Berry, Ormond A. MacDougald, Rea Anunciado-Koza, Robert A. Koza, et Clifford J. Rosen. 2015. « A high fat diet increases bone marrow adipose tissue (MAT) but does not alter trabecular or cortical bone mass in C57BL/6J mice ». *Journal of cellular physiology* 230 (9): 2032- 37. <https://doi.org/10.1002/jcp.24954>.
- Dudele, Anete, Gitte Marie Rasmussen, David Mayntz, Hans Malte, Sten Lund, et Tobias Wang. 2015. « Effects of ambient temperature on glucose tolerance and insulin sensitivity test outcomes in normal and obese C57 male mice ». *Physiological Reports* 3 (5). <https://doi.org/10.14814/phy2.12396>.
- Dunstan, C. R., R. A. Evans, E. Hills, S. Y. Wong, et R. J. Higgs. 1990. « Bone Death in Hip Fracture in the Elderly ». *Calcified Tissue International* 47 (5): 270- 75. <https://doi.org/10.1007/BF02555908>.
- Emans, Pj, Sk Bulstra, et R Kuijer. 2005. « The Effects of Different Decalcification Protocols on TUNEL and General Cartilage Staining ». *Biotechnic & Histochemistry* 80 (3- 4): 111- 15. <https://doi.org/10.1080/10520290500159253>.
- Emerton, KB, B Hu, AA Woo, A Sinofsky, C Hernandez, RJ Majeska, KJ Jepsen, et MB Schaffler. 2010. « OSTEOCYTE APOPTOSIS AND CONTROL OF BONE RESORPTION FOLLOWING OVARECTOMY IN MICE ». *Bone* 46 (3): 577- 83. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2009.11.006>.
- Farley, Antoine, Vasily Gnyubkin, Arnaud Vanden-Bossche, Norbert Laroche, Mieke Neefs, Sarah Baatout, Bjorn Baselet, Laurence Vico, et Carmelo Mastrandrea. 2020. « Unloading-Induced Cortical Bone Loss Is Exacerbated by Low-Dose Irradiation During a Simulated Deep Space Exploration Mission ». *Calcified Tissue International* 107 (2): 170- 79. <https://doi.org/10.1007/s00223-020-00708-0>.
- Fischer, Alexander W., Barbara Cannon, et Jan Nedergaard. 2017. « Optimal housing temperatures for mice to mimic the thermal environment of humans: An experimental study ». *Molecular Metabolism* 7 (octobre): 161- 70. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2017.10.009>.
- . 2018. « Optimal Housing Temperatures for Mice to Mimic the Thermal Environment of Humans: An Experimental Study ». *Molecular Metabolism* 7 (janvier): 161- 70. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2017.10.009>.
- . 2019. « The answer to the question “What is the best housing temperature to translate mouse experiments to humans?” is: thermoneutrality ». *Molecular Metabolism* 26 (mai): 1- 3. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2019.05.006>.
- Forwood, M. R. 1996. « Inducible Cyclo-Oxygenase (COX-2) Mediates the Induction of Bone Formation by Mechanical Loading in Vivo ». *Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 11 (11): 1688- 93. <https://doi.org/10.1002/jbmr.565011112>.

- Fowler, Tristan W., Claire Acevedo, Courtney M. Mazur, Faith Hall-Glenn, Aaron J. Fields, Hrishikesh A. Bale, Robert O. Ritchie, Jeffrey C. Lotz, Thomas P. Vail, et Tamara Alliston. 2017. « Glucocorticoid suppression of osteocyte perilacunar remodeling is associated with subchondral bone degeneration in osteonecrosis ». *Scientific Reports* 7 (mars). <https://doi.org/10.1038/srep44618>.
- Frost, H. M. 1960. « In Vivo Osteocyte Death ». *The Journal of Bone and Joint Surgery. American Volume* 42-A (janvier): 138- 43.
- Ganeshan, Kirthana, et Ajay Chawla. 2017. « Warming the mouse to model human diseases ». *Nature reviews. Endocrinology* 13 (8): 458- 65. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2017.48>.
- Gao, Yan, Kuang Zong, Zackary Gao, Mishaela R. Rubin, Jun Chen, Steven B. Heymsfield, Dymrna Gallagher, et Wei Shen. 2015. « MRI-Measured Bone Marrow Adipose Tissue is Inversely Related to Cortical Bone Area in Children and Adolescents 5– 18 Year Old ». *Journal of clinical densitometry : the official journal of the International Society for Clinical Densitometry* 18 (2): 203- 8. <https://doi.org/10.1016/j.jocd.2015.03.002>.
- Gaskill, Brianna N., Stephanie A. Rohr, Edmond A. Pajor, Jeffrey R. Lucas, et Joseph P. Garner. 2009. « Some like It Hot: Mouse Temperature Preferences in Laboratory Housing ». *Applied Animal Behaviour Science* 116 (2- 4): 279- 85. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2008.10.002>.
- Genetos, Damian C., Derik J. Geist, Liu Dawei, Henry J. Donahue, et Randall L. Duncan. 2005. « Fluid Shear-Induced ATP Secretion Mediates Prostaglandin Release in MC3T3-E1 Osteoblasts ». *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 20 (1): 41- 49. <https://doi.org/10.1359/JBMR.041009>.
- Gerbaix, Maude, Vasily Gnyubkin, Delphine Farlay, Cécile Olivier, Patrick Ammann, Guillaume Courbon, Norbert Laroche, et al. 2017. « One-month spaceflight compromises the bone microstructure, tissue-level mechanical properties, osteocyte survival and lacunae volume in mature mice skeletons ». *Scientific Reports* 7 (juin). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-03014-2>.
- Gluhak-Heinrich, Jelica, Ling Ye, Lynda F. Bonewald, Jian Q. Feng, Mary MacDougall, Stephen E. Harris, et Dubravko Pavlin. 2003. « Mechanical loading stimulates dentin matrix protein 1 (DMP1) expression in osteocytes in vivo ». *Journal of Bone and Mineral Research* 18 (5): 807- 17.
- Gopalakrishnan, Raghavan, Kerim O. Genc, Andrea J. Rice, Stuart M. C. Lee, Harlan J. Evans, Christian C. Maender, Hakan Ilaslan, et Peter R. Cavanagh. 2010. « Muscle Volume, Strength, Endurance, and Exercise Loads During 6-Month Missions in Space ». *Aviation, Space, and Environmental Medicine* 81 (2): 91- 104. <https://doi.org/10.3357/ASEM.2583.2010>.
- Gordon, C. J., P. Becker, et J. S. Ali. 1998. « Behavioral Thermoregulatory Responses of Single- and Group-Housed Mice ». *Physiology & Behavior* 65 (2): 255- 62. [https://doi.org/10.1016/s0031-9384\(98\)00148-6](https://doi.org/10.1016/s0031-9384(98)00148-6).
- Gordon, Christopher J. 2017. « The Mouse Thermoregulatory System: Its Impact on Translating Biomedical Data to Humans ». *Physiology & Behavior* 179 (octobre): 55- 66. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.05.026>.
- Goto, Hisataka, Akira Hozumi, Makoto Osaki, Tatsuya Fukushima, Kazutaka Sakamoto, Akihiko Yonekura, Masato Tomita, Keizo Furukawa, Hiroyuki Shindo, et Hideo Baba. 2011. « Primary Human Bone Marrow Adipocytes Support TNF- α -Induced Osteoclast Differentiation and Function through RANKL Expression ». *Cytokine* 56 (3): 662- 68. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2011.09.005>.
- Grinspoon, S. K., H. B. Baum, V. Kim, C. Coggins, et A. Klibanski. 1995. « Decreased Bone Formation and Increased Mineral Dissolution during Acute Fasting in Young Women ». *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 80 (12): 3628- 33. <https://doi.org/10.1210/jcem.80.12.8530611>.

- Haapasalo, H., S. Kontulainen, H. Sievänen, P. Kannus, M. Järvinen, et I. Vuori. 2000. « Exercise-Induced Bone Gain Is Due to Enlargement in Bone Size without a Change in Volumetric Bone Density: A Peripheral Quantitative Computed Tomography Study of the Upper Arms of Male Tennis Players ». *Bone* 27 (3): 351- 57. [https://doi.org/10.1016/s8756-3282\(00\)00331-8](https://doi.org/10.1016/s8756-3282(00)00331-8).
- Haller, Ann C., et Marilyn L. Zimny. 1977. « Effects of Hibernation on Interradicular Alveolar Bone ». *Journal of Dental Research* 56 (12): 1552- 57. <https://doi.org/10.1177/00220345770560122601>.
- Halloran, B. P., D. D. Bikle, C. M. Cone, et E. Morey-Holton. 1988. « Glucocorticoids and Inhibition of Bone Formation Induced by Skeletal Unloading ». *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 255 (6): E875- 79. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.1988.255.6.E875>.
- Hamrick, Mark W., Ke-Hong Ding, Sumant Ponnala, Serge L. Ferrari, et Carlos M. Isales. 2008. « Caloric Restriction Decreases Cortical Bone Mass but Spares Trabecular Bone in the Mouse Skeleton: Implications for the Regulation of Bone Mass by Body Weight ». *Journal of Bone and Mineral Research* 23 (6): 870- 78. <https://doi.org/10.1359/jbmr.080213>.
- Han, Lizhi, Bo Wang, Ruoyu Wang, Song Gong, Guo Chen, et Weihua Xu. 2019. « The shift in the balance between osteoblastogenesis and adipogenesis of mesenchymal stem cells mediated by glucocorticoid receptor ». *Stem Cell Research & Therapy* 10 (décembre). <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1498-0>.
- Han, Yuefeng, Stephen C. Cowin, Mitchell B. Schaffler, et Sheldon Weinbaum. 2004. « Mechanotransduction and strain amplification in osteocyte cell processes ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (47): 16689- 94.
- Hargens, Alan R., et Sara Richardson. 2009. « Cardiovascular Adaptations, Fluid Shifts, and Countermeasures Related to Space Flight ». *Respiratory Physiology & Neurobiology* 169 (octobre): S30- 33. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2009.07.005>.
- Heino, Terhi J, Teuvo A Hentunen, et H. Kalervo Väänänen. 2004. « Conditioned Medium from Osteocytes Stimulates the Proliferation of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells and Their Differentiation into Osteoblasts ». *Experimental Cell Research* 294 (2): 458- 68. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2003.11.016>.
- Hemmatian, Haniyeh, Rozita Jalali, Cornelis M. Semeins, Jolanda M. A. Hogervorst, G. Harry van Lenthe, Jenneke Klein-Nulend, et Astrid D. Bakker. 2018. « Mechanical Loading Differentially Affects Osteocytes in Fibulae from Lactating Mice Compared to Osteocytes in Virgin Mice: Possible Role for Lacuna Size ». *Calcified Tissue International* 103 (6): 675- 85. <https://doi.org/10.1007/s00223-018-0463-8>.
- Heveran, Chelsea M., Adam Rauff, Karen B. King, R. Dana Carpenter, et Virginia L. Ferguson. 2018. « A new open-source tool for measuring 3D osteocyte lacunar geometries from confocal laser scanning microscopy reveals age-related changes to lacunar size and shape in cortical mouse bone ». *Bone* 110 (mai): 115- 27. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2018.01.018>.
- Iwaniec, Urszula T., Kenneth A. Philbrick, Carmen P. Wong, Jody L. Gordon, Arianna M. Kahler-Quesada, Dawn A. Olson, Adam J. Branscum, et al. 2016. « Room Temperature Housing Results in Premature Cancellous Bone Loss in Growing Female Mice: Implications for the Mouse as a Preclinical Model for Age-Related Bone Loss ». *Osteoporosis international: a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA* 27 (10): 3091- 3101. <https://doi.org/10.1007/s00198-016-3634-3>.
- Jilka, Robert L. 2013. « The Relevance of Mouse Models for Investigating Age-Related Bone Loss in Humans ». *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences* 68 (10): 1209- 17. <https://doi.org/10.1093/gerona/glt046>.

- Jilka, Robert L., Brendon Noble, et Robert S. Weinstein. 2013. « Osteocyte Apoptosis ». *Bone* 54 (2): 264- 71. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2012.11.038>.
- Jing, D., Y. Yi, W. Luo, S. Zhang, Q. Yuan, J. Wang, E. Lachika, Z. Zhao, et H. Zhao. 2019. « Tissue Clearing and Its Application to Bone and Dental Tissues »: *Journal of Dental Research*, avril. <https://doi.org/10.1177/0022034519844510>.
- Kamel-ElSayed, Suzan A., LeAnn M. Tiede-Lewis, Yongbo Lu, Patricia A. Veno, et Sarah L. Dallas. 2015. « Novel approaches for two and three dimensional multiplexed imaging of osteocytes ». *Bone* 76 (juillet): 129- 40. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2015.02.011>.
- Kamioka, H., Y. Miki, K. Sumitani, K. Tagami, K. Terai, K. Hosoi, et T. Kawata. 1995. « Extracellular Calcium Causes the Release of Calcium from Intracellular Stores in Chick Osteocytes ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 212 (2): 692- 96. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1995.2024>.
- Karp, Christopher L. 2012. « Unstressing intemperate models: how cold stress undermines mouse modeling ». *The Journal of Experimental Medicine* 209 (6): 1069- 74. <https://doi.org/10.1084/jem.20120988>.
- Kaya, Serra, Jelena Basta-Pljakic, Zeynep Seref-Ferlengez, Robert J Majeska, Luis Cardoso, Timothy Bromage, Qihong Zhang, et al. 2017. « Lactation-Induced Changes in the Volume of Osteocyte Lacunar-Canalicular Space Alter Mechanical Properties in Cortical Bone Tissue ». *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 32 (4): 688- 97. <https://doi.org/10.1002/jbmr.3044>.
- Keijer, Jaap, Min Li, et John R. Speakman. 2019. « What is the best housing temperature to translate mouse experiments to humans? » *Molecular Metabolism* 25 (avril): 168- 76. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2019.04.001>.
- Kennedy, Oran D., Brad C. Herman, Damien M. Laudier, Robert J. Majeska, Hui B. Sun, et Mitchell B. Schaffler. 2012. « Activation of resorption in fatigue-loaded bone involves both apoptosis and active pro-osteoclastogenic signaling by distinct osteocyte populations ». *Bone* 50 (5): 1115- 22. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2012.01.025>.
- Kennedy, Oran D., Damein M. Laudier, Robert J. Majeska, Hui B. Sun, et Mitchell B. Schaffler. 2014. « Osteocyte Apoptosis is Required for Production of Osteoclastogenic Signals Following Bone Fatigue in vivo ». *Bone* 64 (juillet): 132- 37. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2014.03.049>.
- Knothe, ML Tate, P. Niederer, et U. Knothe. 1998. « In vivo tracer transport through the lacunocanalicular system of rat bone in an environment devoid of mechanical loading. » *Bone* 22 (2): 107- 17.
- Kodama, Y., Y. Umemura, S. Nagasawa, W. G. Beamer, L. R. Donahue, C. R. Rosen, D. J. Baylink, et J. R. Farley. 2000. « Exercise and Mechanical Loading Increase Periosteal Bone Formation and Whole Bone Strength in C57BL/6J Mice but Not in C3H/HeJ Mice ». *Calcified Tissue International* 66 (4): 298- 306. <https://doi.org/10.1007/s002230010060>.
- Lane, Nancy E., Wei Yao, Mehdi Balooch, Ravi K. Nalla, Guive Balooch, Stefan Habelitz, John H. Kinney, et Lynda F. Bonewald. 2006. « Glucocorticoid-Treated Mice Have Localized Changes in Trabecular Bone Material Properties and Osteocyte Lacunar Size That Are Not Observed in Placebo-Treated or Estrogen-Deficient Mice ». *Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 21 (3): 466- 76. <https://doi.org/10.1359/JBMR.051103>.
- Lang, Thomas, Adrian LeBlanc, Harlan Evans, Ying Lu, Harry Genant, et Alice Yu. 2004. « Cortical and Trabecular Bone Mineral Loss From the Spine and Hip in Long-Duration Spaceflight ». *Journal of Bone and Mineral Research* 19 (6): 1006- 12. <https://doi.org/10.1359/JBMR.040307>.

- Lanotte, M., D. Metcalf, et T. M. Dexter. 1982. « Production of Monocyte/Macrophage Colony-Stimulating Factor by Preadipocyte Cell Lines Derived from Murine Marrow Stroma ». *Journal of Cellular Physiology* 112 (1): 123- 27. <https://doi.org/10.1002/jcp.1041120118>.
- LeBlanc, A., T. Matsumoto, J. Jones, J. Shapiro, T. Lang, L. Shackelford, S. M. Smith, et al. 2013. « Bisphosphonates as a Supplement to Exercise to Protect Bone during Long-Duration Spaceflight ». *Osteoporosis International* 24 (7): 2105- 14. <https://doi.org/10.1007/s00198-012-2243-z>.
- LeBlanc, A., V. Schneider, L. Shackelford, S. West, V. Oganov, A. Bakulin, et L. Voronin. 2000. « Bone Mineral and Lean Tissue Loss after Long Duration Space Flight ». *Journal of Musculoskeletal & Neuronal Interactions* 1 (2): 157- 60.
- Li, Wen, Joseph D. Gardinier, Christopher Price, et Liyun Wang. 2010. « Does Blood Pressure Enhance Solute Transport in the Bone Lacunar–Canalicular System? » *Bone* 47 (2): 353- 59. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2010.05.005>.
- Lin, Chuwen, Xuan Jiang, Zhongquan Dai, Xizhi Guo, Tujun Weng, Jun Wang, Yinghui Li, Guoyin Feng, Xiang Gao, et Lin He. 2009. « Sclerostin Mediates Bone Response to Mechanical Unloading Through Antagonizing Wnt/ β -Catenin Signaling ». *Journal of Bone and Mineral Research* 24 (10): 1651- 61. <https://doi.org/10.1359/jbmr.090411>.
- Ling, Yunfeng, Hector F Rios, Elizabeth R Myers, Yongbo Lu, Jian Q Feng, et Adele L Boskey. 2005. « DMP1 Depletion Decreases Bone Mineralization In Vivo: An FTIR Imaging Analysis ». *Journal of Bone and Mineral Research* 20 (12): 2169- 77. <https://doi.org/10.1359/JBMR.050815>.
- Linkhart, Thomas A., Susan G. Linkhart, Yoshiaki Kodama, John R. Farley, H. Peter Dimai, Kenneth R. Wright, Jon E. Wergedal, et al. 1999. « Osteoclast Formation in Bone Marrow Cultures from Two Inbred Strains of Mice with Different Bone Densities ». *Journal of Bone and Mineral Research* 14 (1): 39- 46. <https://doi.org/10.1359/jbmr.1999.14.1.39>.
- Linossier, Marie-Thérèse, Liubov E. Amirova, Mireille Thomas, Myriam Normand, Marie-Pierre Bareille, Guillemette Gauquelin-Koch, Arnaud Beck, et al. 2017. « Effects of short-term dry immersion on bone remodeling markers, insulin and adipokines ». *PLoS ONE* 12 (8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182970>.
- Lloyd, Shane A., Sean E. Morony, Virginia L. Ferguson, Steven J. Simske, Louis S. Stodieck, Kelly S. Warmington, Eric W. Livingston, David L. Lacey, Paul J. Kostenuik, et Ted A. Bateman. 2015. « Osteoprotegerin Is an Effective Countermeasure for Spaceflight-Induced Bone Loss in Mice ». *Bone* 81 (décembre): 562- 72. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2015.08.021>.
- Macias, B. R., J. M. Swift, M. I. Nilsson, H. A. Hogan, S. D. Bouse, et S. A. Bloomfield. 2012. « Simulated Resistance Training, but Not Alendronate, Increases Cortical Bone Formation and Suppresses Sclerostin during Disuse ». *Journal of Applied Physiology* 112 (5): 918- 25. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00978.2011>.
- Maher, Rebecca L., Shayna M. Barbash, Daniel V. Lynch, et Steven J. Swoap. 2015. « Group housing and nest building only slightly ameliorate the cold stress of typical housing in female C57BL/6J mice ». *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 308 (12): R1070- 79. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00407.2014>.
- Maklad, Adel, Suzan Kamel, Elaine Wong, et Bernd Fritzsche. 2010. « Development and Organization of Polarity-Specific Segregation of Primary Vestibular Afferent Fibers in Mice ». *Cell and Tissue Research* 340 (2): 303- 21. <https://doi.org/10.1007/s00441-010-0944-1>.
- Maloney, Shane K., Andrea Fuller, Duncan Mitchell, Christopher Gordon, et J. Michael Overton. 2014. « Translating Animal Model Research: Does It Matter That Our Rodents Are Cold? » *Physiology* 29 (6): 413- 20. <https://doi.org/10.1152/physiol.00029.2014>.

- Marotti, G., D. Farneti, F. Remaggi, et F. Tartari. 1998. « Morphometric Investigation on Osteocytes in Human Auditory Ossicles ». *Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger* 180 (5): 449- 53. [https://doi.org/10.1016/S0940-9602\(98\)80106-4](https://doi.org/10.1016/S0940-9602(98)80106-4).
- Martin, Stephen A, Kenneth A Philbrick, Carmen P Wong, Dawn A Olson, Adam J Branscum, Donald B Jump, Charles K Marik, et al. 2019. « Thermoneutral Housing Attenuates Premature Cancellous Bone Loss in Male C57BL/6J Mice ». *Endocrine Connections* 8 (11): 1455- 67. <https://doi.org/10.1530/EC-19-0359>.
- Metzger, Corinne E., Jessica E. Brezicha, Jon P. Elizondo, S. Anand Narayanan, Harry A. Hogan, et Susan A. Bloomfield. 2017. « Differential Responses of Mechanosensitive Osteocyte Proteins in Fore- and Hindlimbs of Hindlimb-Unloaded Rats ». *Bone* 105 (décembre): 26- 34. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2017.08.002>.
- Milovanovic, Petar, Elizabeth A. Zimmermann, Annika Vom Scheidt, Björn Hoffmann, George Sarau, Timur Yorgan, Michaela Schweizer, Michael Amling, Silke Christiansen, et Björn Busse. 2017. « The Formation of Calcified Nanospherites during Micropetrosis Represents a Unique Mineralization Mechanism in Aged Human Bone ». *Small (Weinheim an Der Bergstrasse, Germany)* 13 (3). <https://doi.org/10.1002/smll.201602215>.
- Momken, Iman, Laurence Stevens, Audrey Bergouignan, Dominique Desplanches, Floriane Rudwill, Isabelle Chery, Alexandre Zahariev, et al. 2011. « Resveratrol Prevents the Wasting Disorders of Mechanical Unloading by Acting as a Physical Exercise Mimetic in the Rat ». *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 25 (10): 3646- 60. <https://doi.org/10.1096/fj.10-177295>.
- Morey-Holton, Emily R., et R. K. Globus. 1998. « Hindlimb Unloading of Growing Rats: A Model for Predicting Skeletal Changes during Space Flight ». *Bone* 22 (5): 83S-88S.
- Moriishi, Takeshi, Ryo Fukuyama, Masako Ito, Toshihiro Miyazaki, Takafumi Maeno, Yosuke Kawai, Hisato Komori, et Toshihisa Komori. 2012. « Osteocyte Network; a Negative Regulatory System for Bone Mass Augmented by the Induction of Rankl in Osteoblasts and Sost in Osteocytes at Unloading ». *PLoS ONE* 7 (6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040143>.
- Nicolella, Daniel P., Donald E. Moravits, Adrian M. Gale, Lynda F. Bonewald, et James Lankford. 2006. « Osteocyte Lacunae Tissue Strain in Cortical Bone ». *Journal of Biomechanics* 39 (9): 1735- 43. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2005.04.032>.
- Nicolella, D.P., J.Q. Feng, D.E. Moravits, A.R. Bonivitch, Y. Wang, V. Dusecich, W. Yao, N. Lane, et L.F. Bonewald. 2008. « Effects of nanomechanical bone tissue properties on bone tissue strain: Implications for osteocyte mechanotransduction ». *Journal of musculoskeletal & neuronal interactions* 8 (4): 330- 31.
- Noble, B. S., H. Stevens, N. Loveridge, et J. Reeve. 1997. « Identification of Apoptotic Changes in Osteocytes in Normal and Pathological Human Bone ». *Bone* 20 (3): 273- 82.
- O'Brien, Charles A., Dan Jia, Lilian I. Plotkin, Teresita Bellido, Cara C. Powers, Scott A. Stewart, Stavros C. Manolagas, et Robert S. Weinstein. 2004. « Glucocorticoids Act Directly on Osteoblasts and Osteocytes to Induce Their Apoptosis and Reduce Bone Formation and Strength ». *Endocrinology* 145 (4): 1835- 41. <https://doi.org/10.1210/en.2003-0990>.
- Orwoll, Eric S, Robert A Adler, Shreyasee Amin, Neil Binkley, E Michael Lewiecki, Steven M Petak, Sue A Shapses, Mehrsheed Sinaki, Nelson B Watts, et Jean D Sibonga. 2013. « Skeletal Health in Long-Duration Astronauts: Nature, Assessment, and Management Recommendations from the NASA Bone Summit: SKELETAL HEALTH IN LONG-DURATION ASTRONAUTS ». *Journal of Bone and Mineral Research* 28 (6): 1243- 55. <https://doi.org/10.1002/jbmr.1948>.
- Pavalko, Fred M., Suzanne M. Norvell, David B. Burr, Charles H. Turner, Randall L. Duncan, et Joseph P. Bidwell. 2003. « A Model for Mechanotransduction in Bone Cells: The Load-Bearing Mechanosomes ». *Journal of Cellular Biochemistry* 88 (1): 104- 12. <https://doi.org/10.1002/jcb.10284>.

- Peres-Ueno, Melise Jacon, Camila Tami Stringhetta-Garcia, Robson Chacon Castoldi, Guilherme Akio Tamura Ozaki, Antônio Hernandes Chaves-Neto, Rita Cássia Menegati Dornelles, et Mário Jefferson Quirino Louzada. 2017. « Model of hindlimb unloading in adult female rats: Characterizing bone physicochemical, microstructural, and biomechanical properties ». *PLoS ONE* 12 (12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189121>.
- Petersen, Nora, Gunda Lambrecht, Jonathan Scott, Natalie Hirsch, Maria Stokes, et Joachim Mester. 2017. « Postflight Reconditioning for European Astronauts – A Case Report of Recovery after Six Months in Space ». *Musculoskeletal Science and Practice* 27 (janvier): S23- 31. <https://doi.org/10.1016/j.msksp.2016.12.010>.
- Piemontese, Marilina, Jinhu Xiong, Yuko Fujiwara, Jeff D. Thostenson, et Charles A. O'Brien. 2016. « Cortical bone loss caused by glucocorticoid excess requires RANKL production by osteocytes and is associated with reduced OPG expression in mice ». *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* 311 (3): E587- 93. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00219.2016>.
- Plotkin, Lilian I. 2014. « Apoptotic osteocytes and the control of targeted bone resorption ». *Current osteoporosis reports* 12 (1): 121- 26. <https://doi.org/10.1007/s11914-014-0194-3>.
- Plotkin, Lilian I., Arancha R. Gortazar, Hannah M. Davis, Keith W. Condon, Hugo Gabilondo, Marta Maycas, Matthew R. Allen, et Teresita Bellido. 2015. « Inhibition of Osteocyte Apoptosis Prevents the Increase in Osteocytic Receptor Activator of Nuclear Factor κ B Ligand (RANKL) but Does Not Stop Bone Resorption or the Loss of Bone Induced by Unloading ». *The Journal of Biological Chemistry* 290 (31): 18934- 42. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.642090>.
- Qing, Hai, Laleh Ardeshirpour, Paola Divieti Pajevic, Vladimir Dusevich, Katharina Jähn, Shigeaki Kato, John Wysolmerski, et Lynda F. Bonewald. 2012. « Demonstration of Osteocytic Perilacunar/Canalicular Remodeling in Mice during Lactation ». *Journal of Bone and Mineral Research* 27 (5): 1018- 29. <https://doi.org/10.1002/jbmr.1567>.
- Rambaut, P. C., C. S. Leach, et P. C. Johnson. 1975. « Calcium and Phosphorus Change of the Apollo 17 Crew Members ». *Nutrition and Metabolism* 18 (2): 62- 69. <https://doi.org/10.1159/000175577>.
- Richardson, Douglas S., et Jeff W. Lichtman. 2015. « Clarifying Tissue Clearing ». *Cell* 162 (2): 246- 57. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.06.067>.
- Robling, Alexander G., Paul J. Niziolek, Lee A. Baldrige, Keith W. Condon, Matthew R. Allen, Imranul Alam, Sara M. Mantila, et al. 2008. « Mechanical Stimulation of Bone *in Vivo* Reduces Osteocyte Expression of Sost/Sclerostin ». *Journal of Biological Chemistry* 283 (9): 5866- 75. <https://doi.org/10.1074/jbc.M705092200>.
- Sakata, Takeshi, Akinori Sakai, Hiroshi Tsurukami, Nobukazu Okimoto, Yuichi Okazaki, Satoshi Ikeda, Toshiyuki Norimura, et Toshitaka Nakamura. 1999. « Trabecular Bone Turnover and Bone Marrow Cell Development in Tail-Suspended Mice ». *Journal of Bone and Mineral Research* 14 (9): 1596- 1604. <https://doi.org/10.1359/jbmr.1999.14.9.1596>.
- Salter, D. M., J. E. Robb, et M. O. Wright. 1997. « Electrophysiological Responses of Human Bone Cells to Mechanical Stimulation: Evidence for Specific Integrin Function in Mechanotransduction ». *Journal of Bone and Mineral Research* 12 (7): 1133- 41. <https://doi.org/10.1359/jbmr.1997.12.7.1133>.
- Saxena, Ritu, George Pan, Erik D. Dohm, et Jay M. McDonald. 2011. « Modeled Microgravity and Hindlimb Unloading Sensitize Osteoclast Precursors to RANKL-Mediated Osteoclastogenesis ». *Journal of Bone and Mineral Metabolism* 29 (1): 111- 22. <https://doi.org/10.1007/s00774-010-0201-4>.
- Scheller, Erica L., William P. Cawthorn, Aaron A. Burr, Mark C. Horowitz, et Ormond A MacDougald. 2016. « Marrow adipose tissue: trimming the fat ». *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 27 (6): 392- 403. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2016.03.016>.

- Sessions, N. D., B. P. Halloran, D. D. Bikle, T. J. Wronski, C. M. Cone, et E. Morey-Holton. 1989. « Bone Response to Normal Weight Bearing after a Period of Skeletal Unloading ». *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, octobre. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.1989.257.4.E606>.
- Shahnazari, Mohammad, Pam Kurimoto, Benjamin M. Boudignon, Benjamin E. Orwoll, Daniel D. Bikle, et Bernard P. Halloran. 2012. « Simulated spaceflight produces a rapid and sustained loss of osteoprogenitors and an acute but transitory rise of osteoclast precursors in two genetic strains of mice ». *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* 303 (11): E1354- 62. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00330.2012>.
- Sharma, Divya, Cesare Ciani, Paula A. Ramirez Marin, Jessica D. Levy, Stephen B. Doty, et Susannah P. Fritton. 2012. « Alterations in the Osteocyte Lacunar-Canalicular Microenvironment due to Estrogen Deficiency ». *Bone* 51 (3): 488- 97. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2012.05.014>.
- Shen, Wei, Rebecca Scherzer, Madeleine Gantz, Jun Chen, Mark Punyanitya, Cora E. Lewis, et Carl Grunfeld. 2012. « Relationship between MRI-Measured Bone Marrow Adipose Tissue and Hip and Spine Bone Mineral Density in African-American and Caucasian Participants: The CARDIA Study ». *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 97 (4): 1337- 46. <https://doi.org/10.1210/jc.2011-2605>.
- Sheng, M. H. -C, D. J Baylink, W. G Beamer, L. R Donahue, C. J Rosen, K. -H. W Lau, et J. E Wergedal. 1999. « Histomorphometric Studies Show That Bone Formation and Bone Mineral Apposition Rates Are Greater in C3H/HeJ (High-Density) than C57BL/6J (Low-Density) Mice during Growth ». *Bone* 25 (4): 421- 29. [https://doi.org/10.1016/S8756-3282\(99\)00184-2](https://doi.org/10.1016/S8756-3282(99)00184-2).
- Siddiqui, Jawed A., et Nicola C. Partridge. 2016. « Physiological Bone Remodeling: Systemic Regulation and Growth Factor Involvement ». *Physiology* 31 (3): 233- 45. <https://doi.org/10.1152/physiol.00061.2014>.
- Simske, S. J., J. J. Broz, M. L. Fleet, T. A. Schmeister, E. C. Gayles, et M. W. Luttges. 1994. « Contribution of Dietary and Loading Changes to the Effects of Suspension on Mouse Femora ». *Journal of Experimental Zoology* 269 (3): 277- 85. <https://doi.org/10.1002/jez.1402690312>.
- Simske, S. J., K. M. Guerra, A. R. Greenberg, et M. W. Luttges. 1992. « The Physical and Mechanical Effects of Suspension-Induced Osteopenia on Mouse Long Bones ». *Journal of Biomechanics* 25 (5): 489- 99.
- Smith, Scott M., Martina A. Heer, Linda C. Shackelford, Jean D. Sibonga, Lori Ploutz- Snyder, et Sara R. Zwart. 2012. « Benefits for Bone from Resistance Exercise and Nutrition in Long-Duration Spaceflight: Evidence from Biochemistry and Densitometry ». *Journal of Bone and Mineral Research* 27 (9): 1896- 1906. <https://doi.org/10.1002/jbmr.1647>.
- Smith, Scott M., Martina Heer, Linda C. Shackelford, Jean D. Sibonga, Jordan Spatz, Robert A. Pietrzyk, Edgar K. Hudson, et Sara R. Zwart. 2015. « Bone Metabolism and Renal Stone Risk during International Space Station Missions ». *Bone, Epigenetic Mechanisms Regulating Bone Biology and Pathology*, 81 (décembre): 712- 20. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2015.10.002>.
- Smith, Scott M., Torin McCoy, Daniel Gazda, Jennifer L. L. Morgan, Martina Heer, et Sara R. Zwart. 2012. « Space Flight Calcium: Implications for Astronaut Health, Spacecraft Operations, and Earth ». *Nutrients* 4 (12): 2047- 68. <https://doi.org/10.3390/nu4122047>.
- Smith, Scott M., Jeannie L. Nillen, Adrian LeBlanc, Allan Lipton, Laurence M. Demers, Helen W. Lane, et Carolyn S. Leach. 1998. « Collagen Cross-Link Excretion during Space Flight and Bed Rest ». *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 83 (10): 3584- 91. <https://doi.org/10.1210/jcem.83.10.5169>.
- Smith, Scott M., Meryl E. Wastney, Boris V. Morukov, Irina M. Larina, Laurence E. Nyquist, Steven A. Abrams, Elena N. Taran, et al. 1999. « Calcium Metabolism before, during, and after a 3-Mo Spaceflight: Kinetic and Biochemical Changes ». *American Journal of Physiology-*

- Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 277 (1): R1- 10. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1999.277.1.R1>.
- Smith, Scott M., Meryl E. Wastney, Kimberly O. O'Brien, Boris V. Morukov, Irina M. Larina, Steven A. Abrams, Janis E. Davis- Street, Victor Oganov, et Linda C. Shackelford. 2005. « Bone Markers, Calcium Metabolism, and Calcium Kinetics During Extended-Duration Space Flight on the Mir Space Station ». *Journal of Bone and Mineral Research* 20 (2): 208- 18. <https://doi.org/10.1359/JBMR.041105>.
- Spatz, Jordan M., Rachel Ellman, Alison M. Cloutier, Leeann Louis, Miranda van Vliet, Larry J. Suva, Denise Dwyer, Marina Stolina, Hua Zhu Ke, et Mary L. Bouxsein. 2013. « Sclerostin Antibody Inhibits Skeletal Deterioration Due to Reduced Mechanical Loading ». *Journal of Bone and Mineral Research* 28 (4): 865- 74. <https://doi.org/10.1002/jbmr.1807>.
- Stähelin, B J, U Marti, M Solioz, H Zimmermann, et J Reichen. 1998. « False positive staining in the TUNEL assay to detect apoptosis in liver and intestine is caused by endogenous nucleases and inhibited by diethyl pyrocarbonate. » *Molecular Pathology* 51 (4): 204- 8.
- Swift, Joshua M., Sibyl N. Swift, Matthew R. Allen, et Susan A. Bloomfield. 2014. « Beta-1 Adrenergic Agonist Treatment Mitigates Negative Changes in Cancellous Bone Microarchitecture and Inhibits Osteocyte Apoptosis during Disuse ». *PLoS ONE* 9 (9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106904>.
- Swoap, Steven J., J. Michael Overton, et Graham Garber. 2004. « Effect of ambient temperature on cardiovascular parameters in rats and mice: a comparative approach ». *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 287 (2): R391- 96. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00731.2003>.
- Tanaka, Kayo, Yuji Yamaguchi, et Yoshiyuki Hakeda. 1995. « Isolated Chick Osteocytes Stimulate Formation and Bone-Resorbing Activity of Osteoclast-like Cells ». *Journal of Bone and Mineral Metabolism* 13 (2): 61- 70. <https://doi.org/10.1007/BF01771319>.
- Tang, SY, R-P Herber, SP Ho, et T Alliston. 2012. « Matrix Metalloproteinase-13 is Required for Osteocytic Perilacunar Remodeling and Maintains Bone Fracture Resistance ». *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 27 (9): 1936- 50. <https://doi.org/10.1002/jbmr.1646>.
- Tavella, Sara, Alessandra Ruggiu, Alessandra Giuliani, Francesco Brun, Barbara Canciani, Adrian Manescu, Katia Marozzi, et al. 2012. « Bone Turnover in Wild Type and Pleiotrophin-Transgenic Mice Housed for Three Months in the International Space Station (ISS) ». Édité par Sudha Agarwal. *PLoS ONE* 7 (3): e33179. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033179>.
- Temiyasathit, Sara, et Christopher R. Jacobs. 2010. « The osteocyte primary cilium and its role in bone mechanotransduction ». *Annals of the New York Academy of Sciences* 1192 (mars): 422- 28. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.05243.x>.
- Tencerova, Michaela, Florence Figeac, Nicholas Ditzel, Hanna Taipaleenmäki, Tina Kamilla Nielsen, et Moustapha Kassem. 2018. « High-Fat Diet-Induced Obesity Promotes Expansion of Bone Marrow Adipose Tissue and Impairs Skeletal Stem Cell Functions in Mice ». *Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 33 (6): 1154- 65. <https://doi.org/10.1002/jbmr.3408>.
- Tiede-Lewis, LeAnn M., Yixia Xie, Molly A. Hulbert, Richard Campos, Mark R. Dallas, Vladimir Dusevich, Lynda F. Bonewald, et Sarah L. Dallas. 2017. « Degeneration of the osteocyte network in the C57BL/6 mouse model of aging ». *Aging*. 26 octobre 2017. <https://doi.org/10.18632/aging.101308>.
- Toyosawa, S., S. Shintani, T. Fujiwara, T. Ooshima, A. Sato, N. Ijuhin, et T. Komori. 2001. « Dentin Matrix Protein 1 Is Predominantly Expressed in Chicken and Rat Osteocytes But Not in Osteoblasts ». *Journal of Bone and Mineral Research* 16 (11): 2017- 26. <https://doi.org/10.1359/jbmr.2001.16.11.2017>.

- Trayhurn, P. 1979. « Thermoregulation in the Diabetic-Obese (Db/Db) Mouse: The Role of Non-Shivering Thermogenesis in Energy Balance ». *Pflügers Archiv European Journal of Physiology* 380 (3): 227- 32. <https://doi.org/10.1007/BF00582901>.
- Tsourdi, Elena, Katharina Jähn, Martina Rauner, Björn Busse, et Lynda F. Bonewald. 2018. « Physiological and pathological osteocytic osteolysis ». *Journal of Musculoskeletal & Neuronal Interactions* 18 (3): 292- 303.
- Tu, Xiaolin, Yumie Rhee, Keith W. Condon, Nicoletta Bivi, Matthew R. Allen, Denise Dwyer, Marina Stolina, et al. 2012. « Sost Downregulation and Local Wnt Signaling Are Required for the Osteogenic Response to Mechanical Loading ». *Bone* 50 (1): 209- 17. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2011.10.025>.
- Umemura, Yoshihisa, David J. Baylink, Jon E. Wergedal, Subburaman Mohan, et Apurva K. Srivastava. 2002. « A Time Course of Bone Response to Jump Exercise in C57BL/6J Mice ». *Journal of Bone and Mineral Metabolism* 20 (4): 209- 15. <https://doi.org/10.1007/s007740200030>.
- Vahidi, G., C. Rux, V. D. Sherk, et C. M. Heveran. 2020. « Lacunar-Canalicular Bone Remodeling: Impacts on Bone Quality and Tools for Assessment ». *Bone*, septembre, 115663. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2020.115663>.
- Veno, P., Daniel Nicoletta, P. Sivakumar, D. Rowe, S.E. Harris, Lynda Bonewald, et Sarah Dallas. 2006. « Live imaging of osteocytes within their lacunae reveals cell body and dendrite motions ». *J Bone Miner Res* 21 (septembre): S38.
- Vico, Laurence, Philippe Collet, Alain Guignandon, Marie-Hélène Lafage-Proust, Thierry Thomas, Mohamed Rehaïlia, et Christian Alexandre. 2000. « Effects of long-term microgravity exposure on cancellous and cortical weight-bearing bones of cosmonauts ». *The Lancet* 355 (9215): 1607- 11.
- Vico, Laurence, et Alan Hargens. 2018. « Skeletal Changes during and after Spaceflight ». *Nature Reviews Rheumatology* 14 (4): 229- 45. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2018.37>.
- Vico, Laurence, Bert van Rietbergen, Nicolas Vilayphiou, Marie-Thérèse Linossier, Hervé Locrelle, Myriam Normand, Mohamed Zouch, et al. 2017. « Cortical and Trabecular Bone Microstructure Did Not Recover at Weight-Bearing Skeletal Sites and Progressively Deteriorated at Non-Weight-Bearing Sites During the Year Following International Space Station Missions: BONE HR-PQCT AFTER SPACEFLIGHT ». *Journal of Bone and Mineral Research* 32 (10): 2010- 21. <https://doi.org/10.1002/jbmr.3188>.
- Vitali, A., I. Murano, M.C. Zingaretti, A. Frontini, D. Ricquier, et S. Cinti. 2012. « The Adipose Organ of Obesity-Prone C57BL/6J Mice Is Composed of Mixed White and Brown Adipocytes ». *Journal of Lipid Research* 53 (4): 619- 29. <https://doi.org/10.1194/jlr.M018846>.
- Wagegg, Markus, Timo Gaber, Ferenz L. Lohanatha, Martin Hahne, Cindy Strehl, Monique Fangradt, Cam Loan Tran, et al. 2012. « Hypoxia Promotes Osteogenesis but Suppresses Adipogenesis of Human Mesenchymal Stromal Cells in a Hypoxia-Inducible Factor-1 Dependent Manner ». *PLOS ONE* 7 (9): e46483. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046483>.
- Wang, Liyun, Yilin Wang, Yuefeng Han, Scott C. Henderson, Robert J. Majeska, Sheldon Weinbaum, et Mitchell B. Schaffler. 2005. « In situ measurement of solute transport in the bone lacunar-canalicular system ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (33): 11911- 16. <https://doi.org/10.1073/pnas.0505193102>.
- Weinbaum, S., S.C. Cowin, et Yu Zeng. 1994. « A Model for the Excitation of Osteocytes by Mechanical Loading-Induced Bone Fluid Shear Stresses ». *Journal of Biomechanics* 27 (3): 339- 60. [https://doi.org/10.1016/0021-9290\(94\)90010-8](https://doi.org/10.1016/0021-9290(94)90010-8).
- Williams, T. D., J. B. Chambers, R. P. Henderson, M. E. Rashotte, et J. M. Overton. 2002. « Cardiovascular responses to caloric restriction and thermoneutrality in C57BL/6J mice ». *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 282 (5): R1459- 67. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00612.2001>.

- Xia, Xuechun, Nidhi Batra, Qian Shi, Lynda F. Bonewald, Eugene Sprague, et Jean X. Jiang. 2010. « Prostaglandin Promotion of Osteocyte Gap Junction Function through Transcriptional Regulation of Connexin 43 by Glycogen Synthase Kinase 3/ β -Catenin Signaling ». *Molecular and Cellular Biology* 30 (1): 206- 19. <https://doi.org/10.1128/MCB.01844-08>.
- Xiong, Jinhu, Marilina Piemontese, Melda Onal, Josh Campbell, Joseph J. Goellner, Vladimir Dusevich, Lynda Bonewald, Stavros C. Manolagas, et Charles A. O'Brien. 2015. « Osteocytes, not Osteoblasts or Lining Cells, are the Main Source of the RANKL Required for Osteoclast Formation in Remodeling Bone ». *PLoS ONE* 10 (9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138189>.
- Yang, Wuchen, Yongbo Lu, Ivo Kalajzic, Dayong Guo, Marie A. Harris, Jelica Gluhak-Heinrich, Shiva Kotha, et al. 2005. « Dentin Matrix Protein 1 Gene Cis-Regulation: USE IN OSTEOCYTES TO CHARACTERIZE LOCAL RESPONSES TO MECHANICAL LOADING *IN VITRO* AND *IN VIVO* ». *Journal of Biological Chemistry* 280 (21): 20680- 90. <https://doi.org/10.1074/jbc.M500104200>.
- Yee, Crista S., Charles A. Schurman, Carter R. White, et Tamara Alliston. 2019. « Investigating Osteocytic Perilacunar/Canalicular Remodeling ». *Current osteoporosis reports* 17 (4): 157- 68. <https://doi.org/10.1007/s11914-019-00514-0>.
- You, Lidan, Stephen C. Cowin, Mitchell B. Schaffler, et Sheldon Weinbaum. 2001. « A model for strain amplification in the actin cytoskeleton of osteocytes due to fluid drag on pericellular matrix ». *Journal of biomechanics* 34 (11): 1375- 86.
- Zaman, G., A. A. Pitsillides, S. C. F. Rawlinson, R. F. L. Suswillo, J. R. Mosley, M. Z. Cheng, L. a. M. Platts, M. Hukkanen, J. M. Polak, et L. E. Lanyon. 1999. « Mechanical Strain Stimulates Nitric Oxide Production by Rapid Activation of Endothelial Nitric Oxide Synthase in Osteocytes ». *Journal of Bone and Mineral Research* 14 (7): 1123- 31. <https://doi.org/10.1359/jbmr.1999.14.7.1123>.
- Zhang, Bing, Esther Cory, Roshmi Bhattacharya, Robert Sah, et Alan R Hargens. 2013. « Fifteen Days Microgravity Causes Growth in Calvaria of Mice ». *Bone* 56 (2): 290- 95. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2013.06.009>.
- Zhang, Dongye, Marianna Miranda, Xiaofei Li, Jiangmeng Han, Yueli Sun, Nancy Rojas, Shan He, et al. 2019. « Retention of osteocytic micromorphology by sclerostin antibody in a concurrent ovariectomy and functional disuse model ». *Annals of the New York Academy of Sciences* 1442 (1): 91- 103. <https://doi.org/10.1111/nyas.13991>.
- Zhang, Keqin, Cielo Barragan-Adjemian, Ling Ye, Shiva Kotha, Mark Dallas, Yongbo Lu, Shujie Zhao, et al. 2006. « E11/Gp38 Selective Expression in Osteocytes: Regulation by Mechanical Strain and Role in Dendrite Elongation ». *Molecular and Cellular Biology* 26 (12): 4539- 52. <https://doi.org/10.1128/MCB.02120-05>.
- Zhang, Yue, Emmanuel M. Paul, Vikram Sathyendra, Andrew Davison, Neil Sharkey, Sarah Bronson, Sundar Srinivasan, Ted S. Gross, et Henry J. Donahue. 2011. « Enhanced Osteoclastic Resorption and Responsiveness to Mechanical Load in Gap Junction Deficient Bone ». *PLoS ONE* 6 (8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023516>.
- Zhao, S., Y. Kato, Y. Zhang, S. Harris, S. S. Ahuja, et L. F. Bonewald. 2002. « MLO-Y4 Osteocyte-Like Cells Support Osteoclast Formation and Activation ». *Journal of Bone and Mineral Research* 17 (11): 2068- 79. <https://doi.org/10.1359/jbmr.2002.17.11.2068>.

Annexes méthodologiques

1. Demande d'autorisation de projet (DAP).....	139
2. Protocole de mise en suspension.....	149
3. Protocoles des analyses μ CT.....	150
3.1 Acquisition μ CT <i>in vivo</i>	150
3.2 Analyse des images μ CT <i>in vivo</i>	151
3.3 Acquisition μ CT <i>ex vivo</i>	151
3.4 Analyse des images μ CT <i>ex vivo</i>	152
4. Protocoles des analyses histomorphométriques.....	153
4.1 Injections tétracyclines.....	153
4.2 Mise à mort et perfusion cardiaque au PFA.....	153
4.3 Inclusions des os en MMA.....	154
4.4 Coupe des sections histologiques.....	155
4.5 Coloration des coupes histologiques.....	155
4.6 Montage des lames histologiques.....	158
5. Protocoles des analyses osmium.....	159
5.1 Coloration osmium.....	159
5.2 Acquisitions et analyses μ CT du marquage osmium.....	160
6. Protocoles des analyses moléculaires.....	161
6.1 Collecte des échantillons.....	161
6.2 Extraction des ARNs.....	162
6.3 Purification des ARNs.....	164
6.4 Quantification des concentrations en ARN par fluorométrie.....	166
6.5 Réaction de rétrotranscription.....	167
6.6 RT-PCR (Real-Time Polymerase Chain Reaction).....	168
7. Protocoles des analyses ELISA.....	173
7.1 Collecte des sérums.....	173
7.2 Dosages ELISA.....	173
8. Protocoles d'analyses de la densité ostéocytaire et des lacunes vides.....	184
8.1 Coupe des rings et coloration DAPI.....	184
8.2 Acquisitions des images rings DAPI.....	185
8.3 Analyses des images rings DAPI.....	186
9. Protocoles des analyses du réseau lacuno-canaliculaire et ostéocytaire.....	188
9.1 Coloration DIL-Fluorescéine.....	188
9.2 Acquisitions des images DIL-Fluorescéine.....	188

9.3 Analyse des images DIL-Fluorescéine.....	190
9.4 Macros Image J pour les analyses des images DIL-Fluorescéine	192

1. Demande d'autorisation de projet (DAP).

1. Informations Générales

Numéro de version	6
1.1. Référence Dossier	201611231457342
1.2. Titre du projet	Mécanismes de la perte osseuse en réponse à l'hypoactivité chronique et applications de contre mesures sur la souris
1.3. Durée du projet	
Nombre d'années	5
Nombre de mois	0
Nombre de jours	0
1.4. Date prévue de début de projet	
Date	08.01.2017

2. Résumé non technique

De nombreuses situations mènent à un déconditionnement osseux important telles que l'immobilisation, un style de vie sédentaire, ou la microgravité ou encore certaines maladies chroniques qui mènent à l'obésité. Ce déconditionnement se caractérise par une perte de masse, un changement de structure et des modifications métaboliques du tissu osseux, le tout augmentant, in fine, le risque fracturaire.

Notre étude a pour but d'analyser la mort des cellules enfouies dans l'os (ostéocytes), les modifications de la vascularisation de la moelle osseuse et du tissu osseux et l'infiltration graisseuse de la moelle dans un modèle d'immobilisation de l'arrière train de souris. Ces paramètres étant susceptibles d'être influencés par l'âge et le sexe, nous étudierons des souris mâles et femelles adultes et âgés. Nous voulons analyser les liens entre tous ces événements et leur séquence d'apparition chez des souris adultes normales. De plus nous avons des souris génétiquement modifiées qui présentent un syndrome métabolique sans adipocytes (et donc sans obésité associée) qui nous permettront d'analyser les conséquences d'une absence de gras dans l'adaptation osseuse à l'immobilisation. Nous voulons aussi vérifier dans quelle mesure la mort des ostéocytes est responsable de l'absence de récupération osseuse après une période d'immobilisation en bloquant le processus qui mène à la mort ostéocytaire (blocage de l'apoptose).

Pour cela, nous avons besoin de 2 procédures expérimentales permettant 1/ de déterminer la cinétique des événements osseux précités et les interrelations entre l'apparition de la graisse médullaire et de la mort ostéocytaire et 2/ de tester si la prévention de la mort ostéocytaire limite ou prévient la perte osseuse et l'invasion lipidique suite à l'immobilisation et suite à une période de récupération. Pour obtenir 3 temps de cinétique chez des mâles et des femelles et à 2 âges différents nous estimons que 644 animaux seront nécessaires pour mener à bien cette étude sur 5 ans. Pour nos expérimentations nous avons prévu le nombre nécessaires d'animaux à la fois pour garder une puissance statistique dans le traitement de nos résultats et pour pallier l'exclusion de certains individus dans l'expérimentation.

Les dispositions prises pour l'application de la règle des 3R seront les suivantes :

- « Réduire » le nombre d'animaux en expérimentation

Pour nos expérimentations, nous avons prévu le nombre nécessaire d'animaux, à la fois pour garder une puissance statistique dans le traitement de nos résultats, et pour pallier l'abandon de certaines souris dans l'expérimentation.

- « Raffiner » la méthodologie utilisée, ce qui implique la notion de points limites (critères d'interruption, ou "end-points") :

Comme développé pour chacun de nos protocoles expérimentaux, nous allons porter une attention particulière au bien-être des animaux. Le suivi quotidien des animaux permet d'identifier des signes de souffrance caractérisés par l'état du pelage, le comportement de la souris (agressivité / apathie), cris, mobilité, alimentation... Le poids corporel sera mesuré tous les deux jours. Dans le cas où un animal présenterait des signes manifestes de souffrance ou perte de poids excessive ($\geq 20\%$ du poids initial), il sera sorti des procédures expérimentales et euthanasié si les signes persistent dans les 24h.

- « Remplacer » les modèles animaux :

Nos questions scientifiques sont centrées sur les effets des différents niveaux de contraintes environnementales sur la physiologie du système osseux et vasculaire intra osseux. Les expérimentations animales avec système intégré sont donc primordiales. Des modifications engendrées au niveau de l'organisme entier, telles que les modifications des sécrétions hormonales par exemple, influencent la cinétique de perte osseuse. De fait, nous nous sommes orientés vers un modèle animal pertinent pour la physiologie osseuse et avons choisi la souris de par l'intérêt des modèles transgéniques disponibles.

Il n'existe pas de modèle cellulaire reproduisant nos procédures expérimentales.

Chaque animal bénéficie d'une attention et de soins de qualité, par du personnel qualifié, pendant les interventions mais aussi en dehors de celles-ci afin d'assurer un bien-être optimal tout au long de l'étude. La douleur est rigoureusement contrôlée grâce à des points limites évalués en amont. Par ailleurs, les animaux sont hébergés dans un environnement enrichi (copeaux, bâtonnets à ronger). Enfin, l'eau et la nourriture sont mises à disposition "ad libitum" et de la musique est diffusée en salle d'hébergement pour diminuer le stress et atténuer les bruits environnementaux.

3. Informations Administratives et Réglementaires

3.1. L'Etablissement Utilisateur

3.1.1. Agrément de l'Etablissement Utilisateur (EU) où seront utilisés les animaux

Nom de l'Etablissement Utilisateur	PLEXAN - PLateforme EXperimentations et ANalyses
Numéro d'agrément	42-18-0801
Date de délivrance de l'agrément	26.05.2016
Civilité	Monsieur
Nom Responsable	Flori
Prénom du responsable	Pierre
Email du responsable	pierre.flori@univ-st-etienne.fr
Civilité	Monsieur
Nom de la personne délégataire du responsable présente dans l'EU	Roux

Page 3

Prénom de la personne délégataire du responsable présente dans l'EU

Email de ce délégataire

3.1.2. Responsable(s) de la mise en œuvre générale du projet dans l'EU et de sa conformité à l'autorisation de projet

Nombre de responsables

Coordonnées du responsable

Civilité

Nom

Prénom

Adresse Postale

Nom du laboratoire

Complément

Numéro

Voie

Code Postal

Ville

Pays

Email

Numéro de téléphone

3.1.3. Responsable(s) du bien être des animaux

Nombre de responsables

Page 4

Coordonnées du responsable

Civilité	Madame/Mademoiselle
Nom	ROUX
Prénom	Ghislaine

Adresse Postale

Nom du laboratoire	PLEXAN
Complément	Campus Santé Innovations- Université Jean Monnet - Faculté de Médecine J.Lisfranc
Numéro	10
Voie	rue de la marandière
Code Postal	42270
Ville	Saint Priest en Jarez
Pays	France
Email	ghislaine.roux@univ-st-etienne.fr
Numéro de téléphone	04 77 42 14 73

3.2. Le Personnel

Conception des procédures expérimentales et des projets	Oui
Application de procédures expérimentales aux animaux	Oui
Soins aux animaux	Oui
Mise à mort des animaux	Oui

3.3. Le Projet

Page 5

3.3.1. Objectif du projet**Le projet est-il**

Justifié d'un point de vue scientifique	Oui
---	-----

Informations concernant cette(ces) justification(s)

Nous évaluons les conséquences de la mort des ostéocytes sur l'invasion lipidique de la moelle osseuse. Ces études ne peuvent pas être effectuées in vitro car nous avons besoin des régulations hormonales et de la complexité de la composition de la moelle osseuse pour répondre à la question posée. Le modèle de suspension par la queue doit être utilisé parce que nous devons reproduire un modèle de déchargement continu sur les membres postérieurs. La seule autre option serait le vol spatial, qui est financièrement inenvisageable. cette étude est validée et financée par le CNES (centre nationale d'étude spatiale) ainsi que l'INSERM et les résultats s'inscrivent dans le projet du prochain vol spatial.

3.3.2. Description du projet

Page 6

La vieillesse et l'augmentation de la vie sédentaire augmentent les risques de développer des problèmes de santé squelettique, avec des maladies telles que l'arthrose et l'ostéoporose touchant un nombre important et croissant de personnes dans le monde entier (Burden of major musculoskeletal conditions (WHO) Anthony D. Woolf & Bruce Pfleger). Récemment, chez l'homme, le tissu adipeux de la moelle osseuse (BMAT) a été corrélé négativement avec la densité minérale osseuse (DMO). Ce tissu adipeux peut être un régulateur important du métabolisme osseux (Ethnic and sex differences in bone marrow adipose tissue and bone mineral density relationship. W. Shen, J. Chen, M. Gantz, M. Punyanitya, S. B. Heymsfield, D. Gallagher, J. Albu, E. Engelson, D. Kotler, X. Pi-Sunyer, and S. Shapses) et (Bone Marrow Adipose Tissue: To Be or Not To Be a Typical Adipose Tissue? Pierre Hardouin, Tarek Rharass and Stéphanie Lucas). Il est donc important d'identifier le rôle du BMAT dans des maladies telles que l'ostéoporose et d'étudier plus en détail les corrélations entre le BMAT et d'autres paramètres morphologiques et pathologiques dans l'os comme la densité, la morphologie et le type des vaisseaux. Les caractéristiques du BMAT, telles que le volume, le type (cMAT vs rMAT), l'emplacement et l'expression génique dans ce tissu osseux sont également à prendre en compte dans l'analyse de ces modèles de maladie. La suspension par la queue a été utilisée comme un modèle de déchargement des membres postérieurs et d'induction de l'ostéoporose chez la souris dans de nombreuses études précédemment publiées. En outre, il a été récemment identifié que les ostéocytes peuvent subir la nécroptose dans des conditions inflammatoires et lors du (The RIP1-RIP3 complex mediates osteocyte necroptosis after ovariectomy in rats. Cui et al 2016) et (Protective effects of necrostatin-1 on glucocorticoid-induced osteoporosis in rats. Feng et al 2014). Par conséquent, l'analyse de la nécroptose des ostéocytes, possible dans le déchargement et l'ostéoporose, est une étude importante à effectuer. Une fragilité osseuse apparaît en réponse à de nombreux stimuli incluant l'immobilisation, un style de vie sédentaire, la microgravité ou encore une maladie chronique telle que le syndrome métabolique. Cette fragilité est notamment marquée par une perte de masse osseuse, une augmentation de la résorption osseuse, une mort ostéocytaire par apoptose, mais également par l'apparition d'infiltrations graisseuses dans la moelle hématopoïétique et une modification du réseau vasculaire intra-osseux. Des liens entre ces changements sont soupçonnés mais leur séquence d'apparition, leurs interrelations ne sont pas connues et leur conséquence sur la réversibilité de la perte osseuse non plus. Actuellement, les thérapies médicamenteuses portent sur l'inhibition de l'activité de résorption osseuse par les ostéoclastes, ou la stimulation de l'activité de la formation osseuse par les ostéoblastes. Or ce sont les ostéocytes qui régulent localement les activités ostéoclastiques et ostéoclastiques. De plus on sait que les ostéocytes, grâce à leurs prolongements dendritiques communiquent entre eux, avec les cellules de la surface osseuse, et avec les capillaires sanguins de la moelle osseuse. Enfin une régulation des adipocytes médullaires par des facteurs sécrétés par les ostéocytes a été récemment mise en évidence. Si les ostéocytes meurent (ces cellules vivent normalement très longtemps, 10 ans chez l'humain), toutes ces régulations seront durablement affectées. Le syndrome métabolique est souvent lié à l'obésité engendrant ainsi un surpoids et des troubles métaboliques. Pour faire la part entre surcharge pondérale et modifications métaboliques, nous utiliserons des souris déficientes en Seipin (gène BSCL2) qui développent le syndrome métabolique mais ne devenant pas obèses, elles ne présentent aucun adipocyte blanc y compris dans la moelle osseuse. Il sera donc pertinent d'utiliser ce modèle pour analyser

Page 7

les conséquences de l'immobilisation au niveau osseux, en particulier sur les aspects vasculaires et ostéocytaires, en absence d'adipocytes.

Notre projet a donc pour but 1°) d'identifier la séquence des changements dans les événements suivants : apoptose ostéocytaire, apparition des gouttelettes lipidiques dans la moelle hématopoïétique, changements vasculaires dans la moelle osseuse et le tissu osseux, augmentation de la résorption ostéoclastique et perte osseuse, 2°) de vérifier l'impact du blocage de l'apoptose ostéocytaire sur les événements précités pendant l'immobilisation, 3°) de vérifier l'impact du blocage de l'apoptose ostéocytaire après la phase d'immobilisation, 4°) de vérifier l'impact d'une absence d'adipocytes (souris Seipin KO) sur ces événements lors d'une immobilisation. Ce projet requiert l'utilisation de 2 procédures expérimentales : 1/ immobilisation par suspension par de 5, 14, et 21 jours chez des souris sauvages C57BL6J des deux sexes et deux âges (12 et 26 semaines) et de 14 jours chez des souris Seipin KO mâles et femelles de 12 semaines ; 2/ suspension de 14 jours chez des souris sauvages C57BL6J de 12 semaines mâles avec injection d'un produit anti-apoptotique pendant la suspension, analyse osseuse après la suspension et après récupération de 14 jours .

3.3.3. Précisez, le cas échéant, la (ou les) méthode(s) de mise à mort prévue(s)

mise à mort par dislocation cervicale

3.3.5. Stratégie d'expérimentation ou d'observation et approche statistique utilisée afin de réduire au minimum le nombre d'animaux, la douleur, la souffrance et l'anxiété infligées, et l'impact environnemental, le cas échéant – si une étude statistique est prévue, indiquez et justifiez les tests choisis :

Pour nos expérimentations, nous avons prévu le nombre nécessaire d'animaux, à la fois pour garder une puissance statistique (test non paramétriques) dans le traitement de nos résultats, et pour palier l'abandon de certaines souris dans l'expérimentation.

Lors des phases expérimentales les souris sont seules dans leur cage à cause du système de suspension par la queue.

les pattes avant reposent sur une grille avec peu de litière afin qu'elles puissent s'accrocher pour se déplacer.

3.4. Les Animaux

3.4.1. Justifiez d'avoir recours à des animaux pour atteindre les objectifs du projet

Page 8

Nos questions scientifiques sont centrées sur les effets des différents niveaux de contraintes environnementales sur la physiologie du système osseux et vasculaire intra osseux. Les expérimentations animales avec système intégré sont donc primordiales. Des modifications engendrées au niveau de l'organisme entier, telles que les modifications des sécrétions hormonales par exemple, influencent la cinétique de perte osseuse. De fait, nous nous sommes orientés vers un modèle animal pertinent pour la physiologie osseuse et avons choisi la souris de par l'intérêt des modèles transgéniques disponibles.

Il n'existe pas de modèle cellulaire reproduisant nos procédures expérimentales.

3.4.2. Espèces animales ou types d'animaux utilisés

Souris (*Mus musculus*) Oui

3.4.3. Justifiez la pertinence de l'(des) espèce(s) choisie(s)

Cette étude utilise des souris modifiées génétiquement et prépare un prochain vol spatial avec des souris. Pour nos expériences le fond C57BL6 est imposé.

3.4.4. S'agit-il de spécimens d'espèces menacées énumérées à l'annexe A du règlement (CE) n° 338/97 du Conseil du 9 décembre 1996 relatif à la protection des espèces de faune et de flore sauvages par le contrôle et leur commerce ? Non

3.4.5. S'agit-il de spécimens de primates non humains ? Non

3.4.6. S'agit-il d'animaux capturés dans la nature ? Non

3.4.7. S'agit-il d'animaux d'espèces domestiques, errants ou vivant à l'état sauvage ? Non

3.4.8. Catégorie des animaux utilisés dans le projet :

Animaux tenus en captivité (domestiques ou non domestiques) Oui

Animaux génétiquement altérés Oui

Animaux génétiquement altérés

Animaux génétiquement modifiés

Création d'une lignée Non

Page 9

Maintien d'une lignée établie et/ou utilisation Oui

Phénotype dommageable Non

3.4.9. Origine des animaux tenus en captivité :

Les animaux destinés à être utilisés dans les procédures expérimentales appartenant aux espèces dont la liste est fixée réglementairement sont-ils élevés à cette fin et proviennent-ils d'éleveurs ou de fournisseurs agréés ?

Oui

Nombre d'établissements éleveur ou fournisseur agréés fournissant tout ou partie des animaux du projet 2

Etablissement éleveur

Nom de l'établissement centre de recherche de saint antoine

Adresse postale

Nom du laboratoire inserm UMR S938

Complément hôpital saint Antoine

Numéro 184

Voie faubourg saint antoine

Code Postal 75012

Ville paris

Pays france

Animaux fournis seipin-/-

Page 10

Etablissement éleveur

Nom de l'établissement	Charles rivers laboratories
Adresse postale	
Voie	Domaine des Oncins- BP 0109
Code Postal	69592
Ville	L'Arbresle cedex
Animaux fournis	C57Bl6
Votre propre établissement utilisateur fournit-il tout ou partie des animaux du projet ?	Non
Un autre établissement utilisateur fournit-il tout ou partie des animaux du projet ?	Oui
Etablissements éleveurs occasionnels non agréés fournissant tout ou partie des animaux du projet	
Nombre d'établissements	0
Etablissements éleveurs ou fournisseurs localisés dans des Etats membres autres que la France fournissant tout ou partie des animaux du projet	
Nombre d'établissements	0
Etablissements éleveurs ou fournisseurs localisés dans des pays tiers fournissant tout ou partie des animaux du projet	
Nombre d'établissements	0
Les animaux sont-ils des animaux réutilisés d'un projet précédent?	Non

Page 11

Animaux utilisés

3.4.10. Nombre d'animaux utilisés dans le projet	644
Justification de ce nombre pour chacune des espèces animales utilisées	
<p>procédure n°1, 476 souris Souris C57BL6 : nous envisageons des périodes de suspension de 5, 14 et 21 jours. Pour chaque temps nous avons des mâles et des femelles âgés soit de 12, soit de 26 semaines. Pour les suspensions de 5 et 21 jours, 13 souris/groupe sont nécessaires. Pour la suspension de 14 jours, 21 souris/groupe sont nécessaires On a donc à 5 ou 21 jours - 13 souris contrôle - 13 souris suspension Soit 26 souris pour chaque période de suspension, sexe et âge. En tout on obtient 208 souris Pour la suspension de 14 jours - 21 souris contrôle - 21 souris suspension Soit 42 souris pour chaque sexe et âge. En tout on obtient 168 souris donc 208+168 = 376 souris Pour les souris Seipin -/- : Ces souris étant difficiles à faire reproduire, nous limitons notre exploration à une suspension de 14 jours chez les plus jeunes (12 semaines) soit 21 contrôle et 21 suspendues soit 84 souris (42 mâles et 42 femelles). Par sécurité nous demandons 100 souris. Procédure n°2 Les mêmes investigations que pour la suspension de 14 jours lors de la procédure n°1 seront effectuées. Il faut donc 21 souris par groupe. - Un groupe suspendu + véhicule - Un groupe suspendu + inhibiteur pan-caspase - Un groupe suspendu + véhicule et récupération - Un groupe suspendu + inhibiteur pan-caspase et récupération Un groupe contrôle + véhicule - Un groupe contrôle + inhibiteur pan-caspase - Un groupe contrôle + véhicule et récupération - Un groupe contrôle + inhibiteur pan-caspase et récupération un seul âge est prévu ici donc en tout 168 souris Total procédure 1 et 2: 644 souris (cf tableau annexe)</p>	
3.4.11. Indiquez à quel(s) stade(s) de développement les animaux seront utilisés et le justifier	

Page 12

les animaux C57BL6 de la procédure n°1 sont utilisés à deux âges "adulte, 12 semaines" et "âgés, 26 semaines" qui correspondent à deux âges squelettiques, les plus jeunes sont en fin de phase de croissance et représentent de jeunes adultes et les plus âgés en phase de perte osseuse, ce qui mime la perte osseuse liée à l'âge chez les humains.

les animaux seipin -/- étant plus fragiles nous ne conservons que les plus jeunes

les animaux de la procédure n°2 sont utilisés dans une expérience qui va mimer et préparer le prochain vol spatial russe BION M2. Nous nous sommes basés sur des animaux identiques (souche, âge, sexe)

3.4.12. Indiquer le sexe des animaux et le justifier

dans la procédure n°1 nous étudierons des mâles et des femelles car les régulations hormonales influent sur les mécanismes étudiés.

3.4.13. Indiquer pour chaque espèce les points limites adaptés, suffisamment prédictifs et précoces pour permettre de limiter la douleur à son minimum, sans remettre en cause les résultats du projet :

La masse corporelle de chaque souris est évaluée minutieusement. Selon notre expérience (Aublard D et al. J Bone Miner Res, 2003) nous nous attendons à ce que les souris s'adaptent au modèle de suspension après une période d'amaigrissement transitoire due à une fonte musculaire et une perte osseuse sans signe de souffrance apparent. Cette perte de poids devrait durer trois jours. Les trois prochains jours la courbe de poids s'inverse et se stabilise à un niveau légèrement inférieur (<10%) Dans tous les cas, si le poids de l'animal diminue de façon critique (≥20% de la masse initiale), il sera immédiatement sorti de l'étude et mis à mort.

Un aménagement du milieu est également prévu notamment par des ouates de cellulose que la souris va grignoter. Par contre, il ne sera pas possible de mettre des objets trop volumineux pour ne pas que la souris puisse poser ses pattes arrières dessus.

Par ailleurs, des bouchons urinaires peuvent se former chez les mâles (surtout au début de la suspension), les animaux sont donc observés au moins deux fois par jour tout au long de l'expérimentation. Si un bouchon est observé l'expérimentateur l'élimine à l'aide d'une compresse imbibée d'une solution désinfectante (Chlorhexidine/Hibitane 5% diluée au 1/100ème).

Nous porterons une attention particulière à l'état du poil, au comportement locomoteur, à l'alimentation, à la prise d'eau (qui seront quantifiées), à la présence de fécès, à l'hydratation cutanée (par test de turgescence de la peau) et au transit comme décrit auparavant.

Le suivi quotidien des animaux permet d'identifier des signes de souffrance caractérisés par l'état du pelage, le comportement de la souris (agressivité, apathie, cris, mobilité, alimentation)

4. Procédures Expérimentales

4.1. Objet(s) visé(s) par les procédures expérimentales

B - Les recherches translationnelles ou appliquées menées pour l'homme et les animaux
 :- la prévention, la prophylaxie, le diagnostic ou le traitement de maladies, de mauvais états de santé ou d'autres anomalies ou de leurs effets chez l'homme, les animaux ou les plantes ;
 - l'évaluation, la détection, le contrôle ou les modifications des conditions physiologiques chez l'homme, les animaux ou les plantes ;
 - le bien-être des animaux et l'amélioration des conditions de production des animaux élevés à des fins agronomiques.

Description des procédures

Nombre de procédures 2

Procédure

Nom de la procédure

Procédure n°1

Suspension anti-orthostatique : Le protocole consiste à suspendre l'animal par le train postérieur

Proposition de classification de la procédure selon le degré de sévérité Classe sévère

Description détaillée de la procédure expérimentale

Pertinence et justification de la procédure expérimentale

Le protocole consiste à suspendre l'animal par le train postérieur. À l'aide d'un lacet mince et d'un fil métallique inséré en son centre, la queue de l'animal sera enveloppée dans le lacet, en veillant à laisser suffisamment de la queue non couverte pour assurer une capacité de thermorégulation adéquate. Le fil sera alors relié à un appareil tel qu'illustré en pièce jointe pour permettre à la souris de se déplacer autour de la cage et de tourner aussi librement que possible ; les pattes avant restant toujours en contact avec le sol. L'angle entre la colonne vertébrale de l'animal et le sol est de 30°, ainsi nous savons que le poids porté par les pattes avant est similaire à celui de la position quadrupède. L'animal est libre de se déplacer grâce au dispositif expérimental de chariot adapté à la dimension de la cage (elle-même conforme à la législation en vigueur) et à la taille de l'animal suspendu (cf photographies). L'animal se déplace donc sur ses pattes avant à l'aide d'une grille placée au-dessus de la litière. La nourriture et la boisson sont à disposition ad libitum et la surveillance visuelle des animaux est effectuée bi-quotidiennement. Pour dormir les animaux se reposent sur le côté (pattes avant au repos) et leur sommeil ne semble pas perturbé.

Il s'agit d'un modèle classique de simulation de la microgravité. Cette expérimentation est largement admise dans la communauté scientifique. Une procédure standard de suspension a été proposée par la NASA (NASA Ames Research Center, Standard operation procedure, Update 2004).

Le modèle de la souris suspendue par le train postérieur (suspension anti-orthostatique) représente le modèle validé par les agences spatiales nationales et internationales pour mimer les effets de la microgravité. En effet cette procédure entrainera une mise en décharge des pattes arrières des souris ainsi qu'une re-répartition des fluides vers l'avant du corps, comme en microgravité.

Ce modèle est aussi utilisé pour étudier les effets de l'immobilisation. Il a également l'avantage d'être réversible car non traumatique. Lorsque l'animal est détaché de son système de suspension, il reprend la pleine capacité des pattes arrière ainsi que toute sa mobilité habituelle. Ce système a notamment déjà été utilisé dans notre équipe (Amblard et al., 2003 ; Malaval et al., 2008). Pour notre étude, les périodes de suspension dureront 5, 14 et 21 jours, durées également retrouvées dans la littérature scientifique. La plus courte durée est celle où l'on observe une apoptose ostéocytaire, à 14 jours on observe une augmentation de la résorption osseuse et une perte osseuse, à 21 jours les activités cellulaires osseuses devraient être stabilisée et la perte osseuse devrait diminuer.

Les souris seront pesées, la première fois, au moment de l'anesthésie pour la mise en suspension. Toutes les autres prises de poids seront effectuées sur souris vigile avec l'ensemble du système de suspension afin de limiter l'impact d'anesthésie répétées sur la vie des souris.

Indiquez le nombre de lots et le nombre d'animaux par lot, et les justifier

Page 15

Nous estimons que 376 souris C57BL6J seront nécessaires pour ce protocole :

Pour chaque durée de suspension, nous avons des souris C57BL6J mâles et femelles âgées respectivement de 12 et 26 semaines. Pour les suspensions de 5 et 21 jours, 13 souris/groupe sont nécessaires : 8 pour de l'histologie et 5 pour des analyses FACS (cytométrie de flux). Pour la suspension de 14 jours, 21 souris/groupe sont nécessaires : 8 pour de l'histologie, 5 pour des analyses FACS et 8 seront perfusées post mortem par du sulfate de baryum pour investigation vasculaire. Aucune souris séipin KO n'est prévu du fait de la difficulté de reproduction et d'obtention de ces animaux.

On a donc à 5 ou 21 jours

- 13 souris contrôle

- 13 souris suspension

Soit 26 souris pour chaque période de suspension, sexe et âge. En tout on obtient 208 souris

Pour la suspension de 14 jours

- 21 souris contrôle

- 21 souris suspension

Soit 42 souris pour chaque sexe et âge. En tout on obtient 168 souris

L'utilisation de la lignée KO Seipin est justifiée par le fait que ces souris dépourvues d'adipocytes mais présentant un syndrome métabolique vont nous permettre d'élucider les effets de l'absence d'adipocytes sur le phénotype osseux lors de la suspension en particulier au niveau ostéocytaire et vasculaire. Ces souris étant difficiles à faire reproduire, nous limitons notre exploration à une suspension de 14 jours chez les plus jeunes (12 semaines) soit 21 contrôle et 21 suspendues soit 84 souris (42 mâles et 42 femelles). Par sécurité nous demandons 100 souris.

Indiquez le cas échéant le prélèvement, ainsi que la fréquence et le(s) volume(s) prélevés

Le dernier jour du protocole, les animaux sont anesthésiés à l'isoflurane, puis un prélèvement sanguin est effectué par ponction cardiaque. L'animal est mis à mort directement après par dislocation cervicale.

Indiquez le cas échéant les méthodes pour réduire ou supprimer la douleur, la souffrance et l'angoisse (liste des médicaments - anesthésiques, analgésiques, anti-inflammatoires...en précisant les doses, voies, durées et fréquences d'administration), y compris le raffinement des conditions d'hébergement, d'élevage et de soins :

Page 16

Afin d'attacher l'animal au système de suspension, la souris est anesthésiée par inhalation d'isoflurane. Ainsi, la souris se réveille rapidement dans sa cage sans stress supplémentaire. Aucun signe de souffrance (agressivité, apathie, cris) au réveil n'est observé.

La masse corporelle de chaque souris est évaluée minutieusement. Après un amaigrissement lié aux 3 premiers jours de la suspension anti-orthostatique (comme décrit dans la littérature), le poids de l'animal se stabilise durant le protocole (Hanson et al., 2012). Aucun analgésique n'est prévu mais si exceptionnellement l'animal présente des signes de souffrance (perte de poids >20%), il sera immédiatement sorti de l'étude et mis à mort.

Un aménagement du milieu est également prévu notamment par des ouates de cellulose que la souris va grignoter. Ceci va permettre d'augmenter le bien être de la souris tout au long de l'expérimentation. Par contre, il ne sera pas possible de mettre des objets trop volumineux pour ne pas que la souris puisse poser ses pattes arrières dessus.

Par ailleurs, des bouchons urinaires peuvent se former chez les mâles (surtout au début de la suspension), les animaux sont donc observés au moins deux fois par jour tout au long de l'expérimentation. Si un bouchon est observé l'expérimentateur l'élimine à l'aide d'une compresse imbibée d'une solution désinfectante (Chlorhexidine/Hibitane 5% diluée au 1/100ème).

Les souris suspendues seront surveillées au moins deux fois par jour tout au long du protocole et nous porterons une attention particulière à l'état du poil, au comportement locomoteur, à l'alimentation et au transit comme décrit auparavant.

Indiquez le cas échéant les dispositions prises en vue de réduire, d'éviter et d'atténuer toute forme de souffrance des animaux de la naissance à la mort :

Aucun analgésique n'est prévu mais si exceptionnellement l'animal présente des signes de souffrance (perte de poids >20%), il sera immédiatement sorti de l'étude et mis à mort.

Dispositions prises pour éviter tout double emploi injustifié des procédures expérimentales, le cas échéant :

L'état de la littérature scientifique ne fait pas part de travaux similaires sur nos paramètres. Les souris KO Seipin sont protégées par MTA (material tranfert agreement) et les procédures décrites ici ne devraient pas être reproduites par ailleurs.

Devenir des animaux à la fin de cette procédure expérimentale

Mise à mort Oui

Précisez les animaux concernés

tous les animaux sont mis à mort par dislocation cervicale.

Page 17

Procédure

Nom de la procédure

procédure n°2 Suspension anti-orthostatique avec injection d'un inhibiteur d'apoptose et potentiel de récupération après la suspension

Proposition de classification de la procédure selon le degré de sévérité Classe sévère

Description détaillée de la procédure expérimentale

Pertinence et justification de la procédure expérimentale

Chez des souris après un vol spatial nous avons observé une mort ostéocytaire importante, ainsi qu'une perte osseuse. Chez des cosmonautes nous avons observé que la récupération osseuse ne se fait pas, voire empire, 12 mois après un vol spatial de 6 mois. De plus chez ces cosmonautes les marqueurs sériques de formation et de résorption osseuse, après un retour à la normale dans les semaines qui suivent l'atterrissage diminuent après le retour sur Terre. Notre hypothèse est que si les ostéocytes meurent pendant le vol spatial, les ostéocytes restant ne sont pas suffisants pour stimuler le remodelage osseux afin de permettre une récupération de l'os perdu pendant le vol. Nous voulons donc bloquer l'apoptose ostéocytaire pour montrer qu'elle est responsable de l'augmentation de la résorption osseuse et de la non récupération de l'os perdu pendant l'exposition à la microgravité.

Des souris C57BL6J mâles seront suspendues par la queue comme décrit dans la procédure expérimentale n°1. Tous les 2 jours, après les pesées, une injection d'un inhibiteur pan-caspase, le quinolyl-valyl-O-methylaspartyl-[-2,6-difluorophenoxy]-methyl-ketone (QVD-OMePhe or QVD, SM Biochemicals, Livermore, CA, USA) sera effectué par injection IP: 20 mg/kg de poids corporel dans du DMSO. Les contrôles auront une injection de DMSO dont la dose sera la plus petite possible, ne dépassant jamais les 10%. Ce produit a déjà été utilisé dans de nombreuses études pour prévenir l'apoptose ostéocytaire (Cardoso et al., J Bone Miner Res. 2009;24:597-605 ; Emerton et al., Bone. 2010;46(3):577-83 ; Kennedy et al., Bone. 2014;64(7):132-7 ; Cabahug-Zuckerman et al., J Bone Miner Res. 2016 Jul;31(7):1356-65).

Un groupe d'animaux suspendu et traité par l'inhibiteur d'apoptose sera libéré du système de suspension et laissé pendant 14 jours pour évaluer le potentiel de récupération.

Les souris seront pesées, la première fois, au moment de l'anesthésie pour la mise en suspension. Toutes les autres prises de poids seront effectuées sur souris vigile avec l'ensemble du système de suspension afin de limiter l'impact d'anesthésie répétées sur la vie des souris.

Cette expérience prépare le prochain vol BION M2 avec des souris C57BL6J mâles de 12 semaines et sera donc effectuée uniquement chez des mâles de cet âge.

Page 18

Indiquez le nombre de lots et le nombre d'animaux par lot, et les justifier

Les mêmes investigations que pour la suspension de 14 jours lors de la procédure n°1 seront effectuées. Il faut donc 21 souris par groupe.

- Un groupe suspendu + véhicule
- Un groupe suspendu + QVD
- Un groupe suspendu + véhicule et récupération
- Un groupe suspendu + QVD et récupération

Soit 84 souris

Cette investigation ne peut pas être effectuée sur les souris servant à la procédure 1 car la diversité des paramètres biologiques à évaluer diffère entre les deux procédures.

Indiquez le cas échéant le prélèvement, ainsi que la fréquence et le(s) volume(s) prélevés

Le dernier jour du protocole, les animaux sont anesthésiés à l'isoflurane, puis un prélèvement sanguin est effectué par ponction cardiaque. L'animal est mis à mort directement après par dislocation cervicale.

Indiquez le cas échéant les méthodes pour réduire ou supprimer la douleur, la souffrance et l'angoisse (liste des médicaments - anesthésiques, analgésiques, anti-inflammatoires...en précisant les doses, voies, durées et fréquences d'administration), y compris le raffinement des conditions d'hébergement, d'élevage et de soins :

Afin d'attacher l'animal au système de suspension, la souris est anesthésiée par inhalation d'isoflurane. Ainsi, la souris se réveille rapidement dans sa cage sans stress supplémentaire. Aucun signe de souffrance (agressivité, apathie, cris) au réveil n'est observé.

La masse corporelle de chaque souris est évaluée minutieusement. Après un amaigrissement lié aux 3 premiers jours de la suspension anti-orthostatique (comme décrit dans la littérature), le poids de l'animal se stabilise durant le protocole (Hanson et al., 2012). Dans tous les cas, si le poids de l'animal diminue de façon critique ($\geq 20\%$ de la masse initiale), il sera immédiatement sorti de l'étude et détaché de la suspension.

Un aménagement du milieu est également prévu notamment par des ouates de cellulose que la souris va grignoter. Ceci va permettre d'augmenter le bien être de la souris tout au long de l'expérimentation. Par contre, il ne sera pas possible de mettre des objets trop volumineux pour ne pas que la souris puisse poser ses pattes arrières dessus.

Par ailleurs, des bouchons urinaires peuvent se former chez les males (surtout au début de la suspension), les animaux sont donc observés au moins deux fois par jour tout au long de l'expérimentation. Si un bouchon est observé l'expérimentateur l'élimine à l'aide d'une compresse imbibée d'une solution désinfectante (Chlorhexidine/Hibitane 5% diluée au 1/100ème).

Les souris suspendues seront surveillées au moins deux fois par jour tout au long du protocole et nous porterons une attention particulière à l'état du poil, au comportement locomoteur, à l'alimentation et au transit comme décrit auparavant.

Page 19

Indiquez le cas échéant les dispositions prises en vue de réduire, d'éviter et d'atténuer toute forme de souffrance des animaux de la naissance à la mort :

Aucun analgésique n'est prévu mais si exceptionnellement l'animal présente des signes de souffrance (perte de poids $>20\%$), il sera immédiatement sorti de l'étude et mis à mort.

Dispositions prises pour éviter tout double emploi injustifié des procédures expérimentales, le cas échéant :

L'état de la littérature scientifique ne fait pas part de travaux similaires sur nos paramètres. Les souris KO Seipin sont protégées par MTA (material transfert agreement) et les procédures décrites ici ne devraient pas être reproduites par ailleurs.

Devenir des animaux à la fin de cette procédure expérimentale

Mise à mort _____ Oui

Précisez les animaux concernés

tous les animaux sont mis à mort par dislocation cervicale.

Page 20

2. Protocole de mise en suspension

Matériel

- Station d'anesthésie (TEM SEGA, Pessac, France).
- Cages de suspension.
- Bandage adhésif élastique Tensoplast (BSN Medical, Le Mans, France).

Protocole

- Mesurer le poids de l'animal.
- Induire l'anesthésie chez la souris avec de l'isoflurane (Flux air 700mL/min, concentration d'induction 2-2.5%, concentration de maintenance 1.5-2%).
- Couper le bandage Tensoplast en bandelettes d'environ 1 cm de largeur et de 10 à 15 cm de longueur.
- Recouvrir la tige métallique de plusieurs couches de bandage Tensoplast afin d'éviter un contact direct de la queue avec le métal.
- Positionner la queue de la souris sur la tige d'attache.
- En commençant par la base de la queue, enrouler 3 bandelettes équidistantes autour de la tige d'attache et de la queue. S'assurer d'une bonne adhésion de la bandelette sur la queue sans que ce bandage ne soit trop serré afin d'éviter toute blessure ischémique.
- Relier la tige d'attache au trolley.
- Arrêter l'anesthésie et laisser se réveiller la souris.
- Mesurer le poids de l'animal avec le système de suspension.
- Installer le trolley sur les tiges traversantes de la cage de suspension.
- Ajuster la hauteur du trolley afin de respecter un angle de suspension de 30°.

3. Protocoles des analyses μ CT

3.1 Acquisition μ CT *in vivo*

Matériel

- Scanner rayons X vivaCT 40 (Scanco Medical, Bassersdorf Switzerland).
- Programme d'évaluation μ CT v6.6 (Scanco Medical, Bassersdorf Switzerland).
- Station d'anesthésie (TEM SEGA, Pessac France).

Protocole

- Induire l'anesthésie chez la souris sous isoflurane (Flux d'air 700 mL/min, concentration d'induction 2-2.5%, concentration de maintenance 1.5-2%).
- Installer le masque d'anesthésie au niveau du portoir du scanner.
- Installer la souris sur le dos dans le portoir, avec le masque d'anesthésie au niveau du museau (Fig.1).
- Passer les membres inférieurs dans le tube.
- Fixer chaque membre avec du scotch de manière à ce que les membres inférieurs soient droits et légèrement sous-tension.
- Sélectionner les paramètres appropriés pour l'acquisition : 70 kV, 114 μ A, voxel 10.5 μ m³, temps d'exposition 250 ms, taille d'ouverture 21.5 mm.
- Effectuer un scout-view au niveau des membres inférieurs et sélectionner la région d'intérêt du scan qui s'étend de 4mm de chaque côté de l'articulation du genou et correspondant à 848 images (Fig.2).
- Démarrer le scan.
- Contrôler régulièrement la respiration de la souris et ajuster le taux d'isoflurane en fonction.
- Une fois le scan terminé, couper l'anesthésie, détacher la souris, et la remettre dans sa cage et dans la pièce d'hébergement à 28°C.

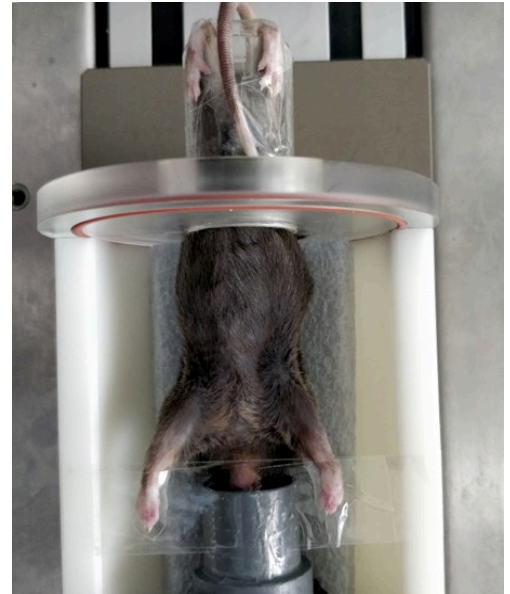


Figure 1 : Mise en place de la souris pour le scan μ CT *in vivo*. Vue de dessus.



Figure 2 : Scout-view des membres postérieurs de la souris. La ROI d'acquisition est délimitée par les traits verts.

3.2 Analyse des images μ CT *in vivo*

Logiciel

- Programme d'évaluation μ CT v6.6 (Scanco Medical, Bassersdorf Switzerland).

Protocole

- Parmi les images, se placer au niveau de la métaphyse d'intérêt.
- Trouver la première image sur laquelle on n'observe plus aucun signe de plaque de croissance en se déplaçant dans la direction contraire de l'articulation du genou.
- Délimiter sur l'image de départ une sélection englobant l'os trabéculaire et excluant l'os cortical (Fig.3).
- Reproduire cette sélection sur 60 images consécutives (630 μ m).
- Analyser le volume sélectionné avec un programme d'analyse trabéculaire incorporant les variables suivantes : Gauss Sigma 1.5, Gauss Support 2, Lower Threshold 180, Upper Threshold 1000.

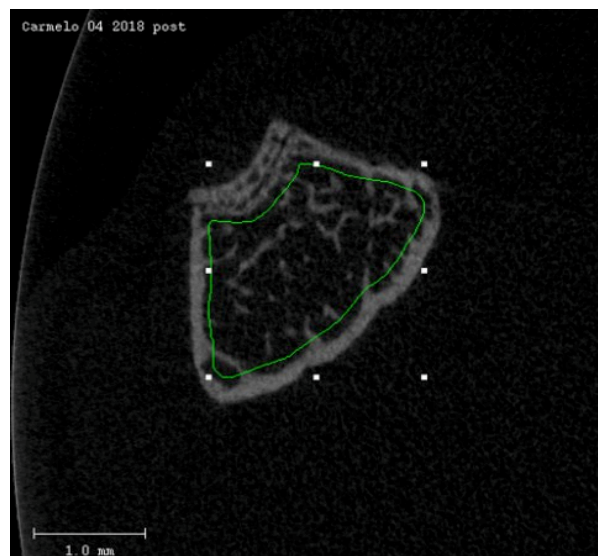


Figure 3 : Image d'un scan *in vivo*. On peut observer ici une image transversale de la métaphyse distale du fémur. La sélection dessinée pour les analyses trabéculaires apparaît en vert.

3.3 Acquisition μ CT *ex vivo*

Matériel

- Scanner rayons X vivaCT 40 (Scanco Medical, Bassersdorf Switzerland).
- Programme d'évaluation μ CT v6.6 (Scanco Medical, Bassersdorf Switzerland).

Solution

- PBS 20% ethanol.

Protocole

- Les os sont scannés dans du PBS 20% éthanol et placés individuellement dans un portoir en plastique afin de s'assurer de la reproductibilité des positions entre chaque scan.
- Sélectionner les paramètres d'acquisition des images : 70 kV, 114 μ A, voxel 10.5 μ m³, temps d'exposition 250 ms, taille d'ouverture 21.5 mm.
- Effectuer un scout-view, et sélectionner la région d'intérêt pour le scan incluant les fémurs/tibias entiers.
- Démarrer le scan.

3.4 Analyse des images μ CT *ex vivo*

Logiciel

- Programme d'évaluation μ CT v6.6 (Scanco Medical, Bassersdorf Switzerland).

Protocole

- Parmi les images, se placer au niveau de la ROI d'intérêt.
- Délimiter sur l'image de départ le contour externe du cortex.
- Reproduire la sélection sur les 60 images consécutives (630 μ m).
- Analyser les volumes sélectionnés avec un programme d'analyse corticale incorporant les variables suivantes : Gauss Sigma 1.5, Gauss Support 2, Lower Treshold 180, Upper Threshold 1000.
- Reproduire la même analyse avec cette fois-ci deux sélections délimitant le contour interne et le contour externe du cortex.

4. Protocoles des analyses histomorphométriques

4.1 Injections tétracyclines

Produits

- Tétracycline hydrochloride #T3383 (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, Etats-Unis).
- Chlorure de Sodium 0.9% Versylene® (Fresenius Kabi, Bad Homburg vor der Höhe, Allemagne).

Protocole

Pour une injection de 200µL :

- Peser 0.75mg de tétracycline.
- Diluer la tétracycline dans 200 µL dans une solution de chlorure de sodium.
- Filtrer la solution avec un filtre stérile de 0.45 µm.
- Stocker la solution de tétracycline à l'obscurité et à 4°C.

La solution de tétracycline se conserve 3 jours maximum. Les injections de tétracycline sont effectuées en intra-péritonéale sous un volume de 200µL avec une aiguille hypodermique. Les injections sont espacées de 5 jours (J7 et J12) pour le protocole de 14 jours et de 4 jours (J1 et J4) pour le protocole de 5 jours.

4.2 Mise à mort et perfusion cardiaque au PFA

Matériel

- Station d'anesthésie (TEM SEGA, Pessac France).
- Pompe.

Produit

- Solution paraformaldéhyde (PFA) 4% #HT501128 (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, Etats-Unis).

Protocole

- Anesthésier la souris sous gaz isoflurane 5%.
- Mettre à mort la souris par dislocation cervicale.
- Disséquer la cage thoracique afin de révéler le cœur.
- Cathétériser le ventricule gauche avec une canule 24G.
- Sectionner l'oreillette droite afin d'éviter une sur-pression du système vasculaire.

- Relier le cathéter au tuyau de la pompe.
- Perfuser à l'aide la pompe la souris avec du PFA 4%.
- Prélever les membres inférieurs, détacher tout tissu musculaire, et séparer le fémur et le tibia à l'aide d'un scalpel.
- Incuber successivement les échantillons 48h pour chaque bain d'alcool: 20% ; 40% ; 60%, 80%, 100%, 100%, 100%.

4.3 Inclusions des os en MMA

Produits

- Ethanol pur (Cooper, Melun, France).
- Méthylméthacrylate (MMA) #25600 (VWR, Radnor, PA, Etats-Unis).
- Isopropanol #818766 (Merck, Darmstadt, Allemagne).
- N,N-Diméthylaniline #803060 (Merck, Darmstadt, Allemagne).
- Sodium hydroxide 1mol/L #480507 (Carlo Erba, Val-de-Reuil, France).
- Benzoyl Peroxide #801641 (Merck, Darmstadt, Allemagne).
- Polyéthylène Glycol 400 g/mol #26602 (VWR, Radnor, PA, Etats-Unis).
- Paraformaldéhyde 4% #HT501128 (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, Etats-Unis).

Préparation des solutions

- Solution MMA :
 - o Mélanger 500mL de MMA et 250 mL de NaOH. Agiter et transvaser dans une ampoule à décanter. Eliminer la phase brune. Effectuer le décantage et le lavage 2 fois.
 - o Incuber la solution 1 jour à -20°C (cristallisation de l'eau).
 - o Filtrer sous vide afin d'éliminer les cristaux.
 - o Ajouter 0.1g de Benzoyl peroxide pour 1mL de solution.
 - o Incuber 1 jour à -20°C.
 - o Filtrer sous vide.
 - o Ajouter 0.11mL de polyéthylène glycol pour 1 mL de solution.
- Catalyseur : 19mL d'isopropanol et 1mL de N,N-Diméthylaniline.

Protocole

- Placer les os dans 5mL de solution MMA dans un flacon en verre.
- Incuber au vacuum pour 20 min.

- Déposer sans fermer le couvercle des jarres, afin de laisser passer l'air.
- Stocker 2 semaines à -20°C.
- Renouveler les 5mL de solution MMA et ajouter 80µL de catalyseur.
- Stocker 48h à -20°C.
- Renouveler la solution MMA pour un volume de 16 mL et ajouter 350 µL de catalyseur.
- Corriger l'orientation du fémur de manière à ce que les condyles soient dirigés vers le haut et perpendiculaires au fond de la jarre.
- Sceller la jarre en verre avec le couvercle afin de s'assurer que l'air ne rentre pas.
- Incuber les jarres à 4°C pour 24h dans un récipient rempli d'eau au ¾ de la hauteur des jarres.

4.4 Coupe des sections histologiques

Matériel

- Microtome SM2500E (Leica, Wetzlar, Allemagne).
- Polisseuse mécanique ESC 200 GTL (ESCIL, Chassieu, France).

Protocole

- Casser les jarres afin de libérer le bloc de MMA contenant le fémur.
- Polir le bloc de MMA de manière à se rapprocher le plus possible du fémur et de corriger si nécessaire l'orientation du fémur de manière à effectuer des coupes respectant le plan longitudinal.
- Effectuer à l'aide du microtome des sections de 9µm d'épaisseur. Stocker temporairement les sections qui seront utilisées pour les analyses tétracycline dans de l'éthanol pur et dans de l'eau pour les sections destinées aux colorations TRAP et Goldner modifié.

4.5 Coloration des coupes histologiques

COLORATION TRAP

Produits

- Sel naphthol AS-TR phosphate disodium #6125 (Merck, Darmstadt, Allemagne).
- Sel Fast Violet B #414-273-3850 (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, Etats-Unis).
- Sodium Fluoride #6441 (Merck, Darmstadt, Allemagne).
- Bleu aniline #86.102-2 (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, Etats-Unis).
- Acide phosphotungstique #583 (Merck, Darmstadt, Allemagne).
- Sodium acétate #S7670 (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, Etats-Unis).

- Sodium Tartrate #6663 (Merck, Darmstadt, Allemagne).
- Milieu de montage Permout® (Fisher Scientific, Hampton, NH, Etats-Unis).

Solutions

- Solution de sodium acétate :
 - o 19g sodium acétate
 - o 4.5mL eau acétifiée (5mL acide acétique dans 1L d'eau distillée)
 - o 1L d'eau distillée
 - o 150mg sodium tartrate
- Solution sodium fluoride : 1L d'eau distillée et 4.2g sodium fluoride.
- Solution bleu aniline :
 - o 0.1g bleu aniline
 - o 3g acide phosphotungstique
 - o 300mL eau distillée

Protocole

- Dissoudre 100mg de Napthol dans 50mL de solution sodium acétate.
- Réserver à 4°C.
- Dissoudre 350mg de Fast Violet dans 50mL de solution sodium acétate. Laisser sous agitation 1 à 2h.
- Filtrer la solution Fast Violet à travers un filtre de 40µm et l'ajouter à la solution de Napthol.
- Incuber les sections dans la solution Naphtol/Fast Violet une nuit à 4°C.
- Rincer les sections dans un bain d'eau et les placer dans un de solution sodium fluoride pour une durée minimum de 30 min à température ambiante.
- Rincer les sections dans un bain d'eau et les placer dans un bain de solution bleu aniline pour 20 min à température ambiante.
- Rincer les sections dans un bain d'eau et les réserver dans de l'éthanol pur jusqu'au montage des lames.

COLORATION TRICHOME DE GOLDNER MODIFIE

Produits

- Acide picrique #621 (Merck, Darmstadt, Allemagne)
- Fuchsine #5231 (Merck, Darmstadt, Allemagne)

- Acide phosphomolybdique #532 (Merck, Darmstadt, Allemagne)
- Vert Lumière #F7252 (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, Etats-Unis)
- Acide acétique #100063 (Merck, Darmstadt, Allemagne)
- Milieu de montage Entellan® #7961 (Merck, Darmstadt, Allemagne)

Solutions

- Solution acide picrique
 - o 3,2g acide picrique
 - o 250mL eau distillée
 - o 2.5 mL acide acétique
- Solution fuchsine
 - o 2.5g fuchsine
 - o 3.2g acide picrique
 - o 250 mL eau distillée
 - o 2.5mL acide acétique
- Solution acide phosphomolybdique
 - o 15g acide phosphomolybdique
 - o 250mL eau distillée
 - o 2.5mL acide acétique
- Solution vert lumière
 - o 2.5g vert lumière
 - o 3.2g acide picrique
 - o 250mL eau distillée
 - o 2.5mL acide acétique

Protocole

- Incuber les sections dans un bain de solution acide picrique une nuit à 4°C.
- Rincer les sections successivement dans un bain d'eau distillée, un d'acide acétique et de nouveau dans de l'eau distillée.
- Incuber les sections dans un bain de solution fuchsine 10 min à température ambiante.
- Rincer les sections successivement dans un bain d'eau distillée, un d'acide acétique et de nouveau dans de l'eau distillée.
- Incuber les sections dans un bain de solution acide phosphomolybdique pour 5min à température ambiante.
- Rincer les sections successivement dans un bain d'eau distillée, d'acide acétique et de nouveau dans de l'eau distillée.
- Rincer les sections quelques secondes dans de l'éthanol 50% puis les réserver dans de l'éthanol pur jusqu'au montage des lames.

4.6 Montage des lames histologiques

Les sections destinées aux analyses tétracycline sont directement montées entre lame et lamelles sans coloration après la coupe.

Produits

- Milieu de montage Entellan® #107961 (Merck, Darmstadt, Allemagne).
- Milieu de montage Permount® (Fisher Scientific, Hampton, NH, Etats-Unis).
- Ethanol pur (Cooper, Melun, France).
- Méthylcyclohexane #528261 (Carlo Erba, Val-de-Reuil, France).
- Toluène.

Protocole

- Plonger la section quelques secondes dans deux bains d'éthanol pur successifs.
- Sécher la section contre du papier absorbant.
- Plonger la section quelques secondes dans un bain de méthylcyclohexane contenant quelques gouttes de toluène.
- Monter la section entre lame et lamelle avec un goutte de milieu de montage Entellan® pour les sections tétracycline et Goldner et de milieu de montage Permount® pour les coupes TRAP.
- Stocker les lames à l'obscurité jusqu'aux lectures.

5. Protocoles des analyses osmium

5.1 Coloration osmium

Matériel

- Scanner à rayons X VivaCT 40 ((Scanco Medical, Bassersdorf, Switzerland).
- Programme d'évaluation μ CT v.6.6 (Scanco Medical, Basserdorf, Switzerland).

Produits

- Tétroxyde d'osmium #19132 (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, Pennsylvanie, Etats-Unis).
- Potassium dichromate #483044 (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri, Etats-Unis).
- Acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA) #E5134 (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri, Etats-Unis).
- Sodium hydroxyde #S5881 (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri, Etats-Unis).

Solutions

- Solution de tétrouxyde d'osmium à 2% dans de l'eau.
- Solution de potassium dichromate à 5% dans de l'eau.
- Solution d'EDTA à 0.5M :
 - o Chauffer 400 mL d'eau à 80°C.
 - o Ajouter et laisser dissoudre 10g de sodium hydroxyde et 93g d'EDTA.
 - o Laisser refroidir et vérifier le pH à 7.5.

Protocole

- Décalcification : stocker les os dans la solution d'EDTA pendant 14 jours à 4°C. Renouveler la solution d'EDTA toutes les 48h.
- Rincer les os décalcifiés à l'aide de PBS afin d'éliminer toute trace d'EDTA.
- Mélanger des volumes égaux de solution de tétrouxyde d'osmium 2% et de solution de potassium dichromate 5%.
- Couper transversalement la diaphyse à un point éloignée de la ROI (métaphyse proximale pour le tibia, métaphyse distale pour le fémur) afin de favoriser l'imprégnation de la moelle osseuse.
- Placer les os dans la solution de tétrouxyde d'osmium 2% et la solution de potassium dichromate 5%, côté coupé dirigé vers le haut.

- Placer les échantillons dans un vacuum pendant 20 min.
- Stocker les échantillons à température ambiante 72h à l'obscurité.
- Retirer les os de la solution de travail et les rincer à l'eau.
- Réserver les échantillons dans du PBS à 4°C.

5.2 Acquisitions et analyses μ CT du marquage osmium

Matériel

- Scanner à rayons X VivaCT 40 ((Scanco Medical, Bassersdorf, Switzerland).
- Programme d'évaluation μ CT v.6.6 (Scanco Medical, Basserdorf, Switzerland).

Protocole d'acquisition

- Les os sont scannés dans une solution PBS.
- Effectuer un scout-view.
- Sélectionner la ROI d'intérêt (e.g métaphyse)
- Effectuer un scan avec les paramètres d'acquisition suivants : 70 kV, 114 μ A, voxel 10.5 μ m», temps d'intégration 500 ms, taille d'ouverture 21.5 mm.

Protocole d'analyse

- Créer une ROI 3D identique à celle utilisée pour les analyses trabéculaires, étendue sur 60 images soit 630 μ m d'épaisseur.
- Analyser le volume créé par la ROI par le programme d'analyse trabéculaire avec les paramètres suivants : Gauss Sigma 0.5, Gauss Support 3, Lower Treshold 350 et Upper Threshold 1000.
- Le volume de gras en mm^3 et le ratio volume de gras/volume de la moelle osseuse en % sont alors calculés par le logiciel.

6. Protocoles des analyses moléculaires

6.1 Collecte des échantillons

Les échantillons pour les analyses moléculaires sont collectés au jour final du protocole J5 ou J14. Le cortex et la moelle osseuse sont dissociés afin de les analyser séparément.

Matériel

- Hotte chimique.
- Station d'anesthésie (TEM SEGA, Pessac, France).
- Centrifugeuse 5702 R (Eppendorf, Hambourg, Allemagne).
- Boîtes de Pétri stériles 10 cm.
- Seringues 10 mL stériles.
- Aiguilles 25G 5/8 RB 0,5 x 16 mm.
- Tubes Falcon 15 mL.
- Alcool.
- Eau DEPC (pyrocarbonate d'éthyle).
- PBS stérile.
- TRI Reagent® (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri, Etats-Unis).
- Cryotubes contenant une bille de broyage en de diamètre.
- Azote liquide.

Protocole

- Anesthésier la souris (flux d'air 700mL/min, concentration 5%).
- Décapiter la souris afin de récolter le sang ou effectuer une dislocation cervicale.
- Prélever les fémurs et les tibias le plus rapidement et proprement possible.
- Nettoyer avec précaution les os des muscles et tendons.
- Déposer les os dans une boîte de pétri propre

Sous hotte PSM sur champs stériles avec des outils stériles :

- Oter les épiphyses à l'aide d'une pince.
- A l'aide d'une aiguille 25 G « casser » l'os trabéculaire.
- Au-dessus d'une boîte de Pétri propre, flusher la moelle avec environ 5 mL de PBS stérile (jusqu'à ce que l'os devienne blanc).
- Récupérer le surnageant dans un tube Falcon 15 mL.

- Centrifuger à 800g pendant 5 min à 4°C.
- Pendant la centrifugation, placer les cortex dans des cryotubes et réserver dans de l'azote liquide.
- Jeter le surnageant.
- Reprendre le culot avec 5mL de Trizol
- Réserver les tubes dans de la glace.
- Stocker tous les échantillons à -80°C jusqu'à utilisation.

6.2 Extraction des ARNs

6.2.1 Préparation des lysats tissulaires (échantillons cortex)

Matériel

- Hotte chimique.
- Homogénéisateur broyeur vibrant Mikro-Dismembrator S (Sartorius AG, Göttingen, Allemagne).
- Azote liquide
- Pincettes et ciseaux stériles
- TRI Reagent® (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri, Etats-Unis)

Protocole

- Sortir les échantillons du stockage à -80°C et les placer dans de l'azote liquide.
- Préparer un contenant en polystyrène avec de l'azote liquide pour travailler.
- Réserver le plot de vibration et les échantillons dans l'azote.
- Avec des ciseaux stériles, découper les cortex à l'intérieur des cryotubes.
- Refermer les cryotubes et les placer dans le plot de vibration.
- Mettre en place le plot dans l'homogénéisateur.
- Lancer un programme de 20 sec. à 2000 rpm.

Sous hotte chimique :

- Ajouter 1mL de TRI Reagent® dans chaque cryotube.
- Vortexer les cryotubes.
- Laisser reposer 2 min à température ambiante.
- Stocker à -80°C.

6.2.2 Pré-extraction des acides nucléiques du cortex

Matériel

- Hotte chimique.
- Centrifugeuse 5810 R (Eppendorf, Hambourg, Allemagne)
- Tubes Eppendorf® 5mL.
- TRI Reagent® (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri, Etats-Unis)

Protocole

Au préalable :

- Allumer la centrifugeuse pour refroidissement à 5°C. Régler la vitesse d'accélération à 9 et la vitesse de décélération à 7.
- Laisser décongeler les cryotubes (lysats tissulaires) à température ambiante.
- Préparer 3 séries de tubes Eppendorf® 5mL pour chaque échantillon.

Pour chaque échantillon :

- Vortexer fortement le cyotube
- Réserver le lysat dans un tube Eppendorf® 5mL
- Ajouter 1mL de TRI Reagent® dans le cryotube
- Vortexer fortement le cyotube
- Réserver le lysat dans un tube Eppendorf® 5mL
- Ajouter 1mL de TRI Reagent® dans le cryotube
- Vortexer fortement le cyotube
- Réserver le lysat dans un tube Eppendorf® 5mL. On obtient un volume final de lysat tissulaire de 3 mL dans les tubes Eppendorf® 5mL.
- Centrifuger 10 min (10 000g, 5°C)
- Réserver le surnageant dans un nouveau tube Eppendorf® 5mL
- Continuer le protocole d'extraction des acides nucléiques.

6.2.3 Extraction des acides nucléiques (cortex et moelle osseuse)

Matériel

- Hotte chimique.
- Centrifugeuse 5810 R (Eppendorf, Hambourg, Allemagne).

Produits

- Chloroforme (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri, Etats-Unis)
- Isopropanol (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri, Etats-Unis)
- Eau stérile qualité biologie moléculaire (Eurobio, Courtaboeuf, France).

Préparation des solutions

- Ethanol 70% : diluer de l'éthanol 100% dans de l'eau Eurobio.

Protocole

Pour chaque échantillon :

- Ajouter 600 µL de chloroforme (200µL/mL de TRI Reagent®).
- Inverser, vortexer, incuber 3 min à température ambiante.
- Inverser, centrifuger 20 min (10 000g, 5°C).
- Récupérer le surnageant dans le 3^{ème} tube Eppendorf® 5mL.
- Ajouter 1.5mL d'isopropanol (500µL/mL de TRI Reagent®).
- Inverser, vortexer fortement.
- Stocker une nuit à -20°C (précipitation).
- Inverser, vortexer, centrifuger 45 min (10 000g, 5°C).
- Eliminer l'isopropanol.
- Ajouter 3mL d'éthanol 70% (1mL/mL de TRI Reagent®).
- Inverser, vortexer, centrifuger 15 min (10 000g, 5°C).
- Eliminer l'éthanol 70%.
- Laisser évaporer l'éthanol quelques instants.
- Ajouter 50µL d'eau stérile Eurobio.
- Incuber 5 min dans un bain-marie à 55°C.
- Vortexer.
- Centrifuger le temps d'atteindre 1500g.
- Stocker à -80°C.

6.3 Purification des ARNs

Matériel

- Centrifugeuse.
- Kit RNeasy Plus Mini (Qiagen, Hilden, Allemagne).

- Eau stérile qualité biologie moléculaire (Eurobio, Courtaboeuf, France).
- Ethanol 70%.
- β -Mercaptoéthanol (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri, Etats-Unis).

Protocole

Au préalable :

Préparer pour chaque échantillon : 1 colonne de rétention ADN violette Qiagen (kit), 1 colonne de rétention ARN rose Qiagen (kit), 3 tubes collecteurs Qiagen (kit), 1 tube Eppendorf® low bind 1.5mL. Disposer chaque colonne dans un tube collecteur.

Pour chaque échantillon :

- Reprendre l'extrait d'ARN (50 μ L) avec 350 μ L de Tampon de Lyse RLT⁺ (kit) et 3.5 μ L de β -Mercaptoéthanol.
- Homogénéiser par aspi-refoules et transférer dans une colonne de rétention ADN violette.
- Centrifuger 23 sec. (10 000g, température ambiante).
- Reprendre l'éluat avec 400 μ L d'éthanol 70%
- Homogénéiser par aspi-refoules et transférer dans une colonne de rétention ARN rose.
- Centrifuger 23 sec. (10 000g, température ambiante).
- Réserver l'éluat dans la colonne de rétention ADN violette.
- Ajouter 700 μ L de Tampon de lavage RW1 (kit) dans la colonne de rétention ARN rose.
- Centrifuger 23 sec. (10 000g, température ambiante)
- Eliminer l'éluat.
- Ajouter 500 μ L de Tampon de lavage RPE (kit) dans la colonne de rétention ARN rose.
- Centrifuger 23 sec. (10 000g, température ambiante)
- Eliminer l'éluat.
- Ajouter 500 μ L de Tampon de lavage RPE (kit) dans la colonne de rétention ARN rose.
- Centrifuger 2 min. (10 000g, température ambiante)
- Placer la colonne de rétention ARN rose dans un nouveau tube collecteur.
- Centrifuger à sec 1 min. (10 000g, température ambiante).
- Placer la colonne de rétention ARN rose dans le tube Eppendorf® 1.5mL.
- Ajouter 50 μ L d'eau Eurobio au centre de la membrane de la colonne de rétention ARN rose. Ne pas toucher la membrane.
- Incuber 5 min. à température ambiante.
- Centrifuger 1 min. (10 000g, température ambiante)
- Reprendre l'éluat pour le déposer de nouveau au centre de la membrane de la colonne rose.
- Incuber 3 min. à température ambiante.

- Centrifuger 2 min. (10 000g, température ambiante).
- Stockage à -80°C.

L'intégrité et la concentration des extraits ARN purifiés sont analysés par le système Experion™ Automated Electrophoresis (BioRad, Hercules, Californie, Etats-Unis).

6.4 Quantification des concentrations en ARN par fluorométrie

Principe

Une molécule marquée par un groupement cyanine (RiboGreen®) est ajoutée aux extraits d'ARN purifiés. Des complexes spécifiques ARN-Ribogreen sont formés et émettent une fluorescence dont l'intensité est proportionnelle à la quantité d'ARN.

Matériel et solutions

- Thermocycleur CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (BioRad, Hercules, Californie, Etats-Unis).
- Kit et réactifs Quant-iT™ RiboGreen® RNA
- Plaque PCR 96 puits Hard-Shell® 96-Well full B/W #HSS9665 (BioRad, Hercules, Californie, Etats-Unis)
- Eau stérile qualité biologie moléculaire (Eurobio, Courtaboeuf, France).

Préparation des réactifs et échantillons

- Tampon TE 1X : diluer le Tampon TE 20X (kit) au 1/20^e dans de l'eau Eurobio®.
- ARN ribosomal étalon (1µg/mL) : diluer la solution d'ARN ribosomal étalon 100 µg/mL (kit) au 1/100^e dans du Tampon TE 1X.
- Echantillons : diluer les extraits d'ARN purifiés de manière à respecter le range de la gamme étalon du kit 0 à 0.5 µg/mL soit 10 à 100 ng/puit.

Protocole

- Déposer en duplicat le volume nécessaire de Tampon TE 1X et d'ARN ribosomal 1µg/mL afin de constituer la gamme étalon :

Concentration (µg/mL)	Tampon TE 1X (µL/puit)	ARNr 1µg/mL (µL/puit)
0	100	0

0.050	90	10
0.125	75	25
0.250	50	50
0.375	25	75
0.500	0	100

- Dans tous les autres puits, déposer 80µL de Tampon TE 1X.
- Déposer 20 µL/puit des échantillons ARN dilués.
- Au dernier moment et après avoir préparé le thermocycleur et le logiciel, diluer le RiboGreen® (kit) au 1/200^e dans du Tampon TE 1X.
- Déposer 100 µL/puit de RiboGreen® dilué.
- Déposer un film plastique et protéger la plaque de la lumière.
- Centrifuger brièvement.
- Lire immédiatement l'intensité de la fluorescence à 510 nm.

Calculs des résultats

Le logiciel CFX Manager donne les données RFU (relative fluorescence units) de chaque puit. Les valeurs RFU sont corrigées par la valeur du BLANC ainsi que par les facteurs de dilutions et de dosages. La gamme étalon est modélisée par une régression linéaire. Les concentrations des échantillons sont alors calculées à partir de cette fonction.

6.5 Réaction de rétrotranscription

Matériel

- MJ Mini Thermal Cycler (BioRad, Hercules, Californie, Etats-Unis)
- Kit iScript™ cDNA Synthesis Kit (BioRad, Hercules, Californie, Etats-Unis)
- Tubes Eppendorf® 200 µL.
- Tubes Eppendorf® low bind 500µL.
- Eau stérile qualité biologie moléculaire (Eurobio, Courtaboeuf, France).

La réaction de rétro-transcription est effectuée à partir de 1 ou 2 μg d'ARN purifié. Le volume nécessaire d'ARN purifié (pour la quantité en μg voulue) et d'eau Eurobio sont calculés pour obtenir un volume final de 30 μL ou 15 μL .

Protocole

Le protocole suivant est indiqué pour une rétro-transcription à partir d'1 μg d'ARN. Le volume nécessaire d'ARN purifié correspondant à 1 μg et d'eau Eurobio est calculé pour obtenir un volume final de 15 μL .

- Déposer dans chaque puit le volume d'eau Eurobio calculé pour chaque échantillon.
- Déposer le volume d'ARN purifié pour chaque échantillon.
- Placer la plaque dans le thermocycleur et effectuer un programme de 5 min à 65°C.
- Incuber la plaque 5 min à 4°C.
- Préparer le mix RT : 4 μL de mix iScript (kit) et 1 μL d'enzyme RT iScript (kit) par puit.
- Déposer 5 μL /puits de mix RT préparé.
- Placer la plaque dans le thermocycleur et effectuer le programme suivant :
 - o 5 min à 25°C
 - o 30 min à 42°C
 - o 5 min à 85°C
 - o 4°C for ever
- Ajouter 80 μL /puits d'eau Eurobio.

On obtient une concentration finale en cDNA de 1 μg /100 μL .

- Transférer le contenu de chaque puit dans des tubes Eppendorf® low bind 500 μL .
- Stocker à -20°C.

6.6 RT-PCR (Real-Time Polymerase Chain Reaction)

Matériel

- CFX96 Real-Time Thermal Cycler (BioRad, Hercules, Californie, Etats-Unis).
- Plaque PCR Hard-Shell® Thin-Wall Skirted #HSP9601 (BioRad, Hercules, Californie, Etats-Unis).
- Kit LightCycler FastStart DNA Master^{PLUS} HybProbe (Roche, Basel, Switzerland).

Préparation des réactifs et échantillons

- Mix : mélanger 1 tube "1a" (enzyme) avec 3 tubes "1b" (reaction mix) (kit).

- Mix PCR (par puit) : 4µL de Mix, 0.25/0.5/1 µL (suivant indication) de primers sens, 0.25/0.5/1 µL (suivant indication) de primers anti-sens, compléter avec de l'eau (kit) pour obtenir un volume final de 12 µL par puit.
- Préparation des échantillons : les cDNA sont dilués au ¼.
- Gamme étalon : un pool de cDNA de cortex et de moelle osseuse à J5 et J14 est dilué au 1/10^e, 1/40^e, 1/160^e, 1/640^e, 1/2560^e dans de l'eau Eurobio.

Protocole

- Déposer 12 µL/puit de Mix PCR.
- Déposer 8 µL/puit d'échantillon ARN.
- Recouvrir la plaque avec un film plastique.
- Centrifuger brièvement.
- Placer la plaque dans le thermocycleur.

Sur le logiciel CFX Manager, démarrer un programme PCR avec les paramètres suivants :

- PHASE 1 – amplification ADNc (x44)
 1. 10 min à 95°C (activation enzyme)
 2. 10 sec à 95°C (ouverture des brins)
 3. 12 sec à 63/65/67°C (hybridation des amorces)
 4. 15 sec à 72°C (élongation des brins)
- PHASE 2 – contrôle spécificité (x1)
 1. 1 sec. A 95°C
 2. 30 sec. à 68°C
 3. 1 sec. à 68°C
 4. 0.5 sec à 95°C
 5. 1 min. à 45°C

Calcul des résultats

Le logiciel CFX Manager créer une courbe d'étalonnage à partir de la gamme étalon (dilutions du pool de cDNA) avec le logarithme de la quantité initiale (Q_0 ou SQ) le long de l'axe x et leurs valeurs Ct (cycle seuil) respectives le long de l'axe y. Une réaction de RT-PCR est estimée valide si cette courbe d'étalonnage modélisée par une régression linéaire présente un $R^2 > 0.98$ et une efficacité d'amplification comprise entre 90 et 105%. Les quantités initiales (Q_0 ou SQ) inconnues des échantillons sont alors calculées automatiquement par le logiciel en dérivant l'équation suivante :

$$\log Q_{Ct} = \log Q_0 + Ct * \log E$$

Soit

$$Q_{Ct} = Q_0 (E)^{Ct}$$

C_t : nombre de cycle d'amplification nécessaire pour obtenir un signal fluorescent statistiquement significatif par rapport au bruit de fond.

Q_{C_t} : nombre de copies ADN au cycle seuil C_t .

Q_0 : nombre de copies ADN initiales (à t_0 de la réaction).

E : efficacité de la réaction d'amplification.

Tableau 1 : Caractéristiques des primers utilisés pour les analyses RT-PCR.

Gène	Référence NM	Amorce sens	Amorce anti sens	Position amorces	Volume primers	Température hybridation	Pic melting
<i>Gènes de référence</i>							
Gusβ	NM_010368.1	ccgattatccagagcgagta	ctctccgaccacgtattctt	1603-1752	0.5 µL	60°C	84°C
HPRT	NM_013446.2	gcgtcgtgattagcgtgat	catgacatctcagcaagtct	166-308	0.5 µl	60°C	79°C
<i>Gènes du remodelage osseux</i>							
OPG	NM_008764.3	tcctgggtcctcctggacatc	cactcctgcttcacggactg	263-527	1.0 µl	63°C	86°C
Sost	NM_024449.5	tcctcctgagaacaaccagac	tgtcaggaagcgggtgtagtg	180-306	0.5 µl	65°C	87.0°C
RANKL	NM_011613.3	agcatcgctctgttctctgta	ccatgagccttccatcatag	344-604	1.0 µl	63°C	86.0°C
MMP13	NM_008607.2	gatggcactgctgacatcat	tgtagcctttggaactgctt	516-687	1.0 µl	60°C	82.5-83.0°C
CSF1	NM_007778.4	ggagacttcatgccagattg	gccttgttctgctcctcata	583-804	1.0 µL	63°C	83.5°C
TRAP	NM_001102405.1 var 1	ggcaactgtctctgcacagat	ttgagccaggacagctgagt	483-706	1.0 µl	65°C	87.0°C
CathK	NM_007802.4	tgaccactgcctccaatac	tgccgtggcgttatacatac	673-776	1.0 µl	63°C	83.0°C
<i>Gènes d'apoptose</i>							
FOXO3	NM_019740	cctgtcctatgccgacctga	ggttgtgccggatggagttc	799-962	0.5 µl	65°C	87.5°C
DDIT3	NM_007837	ggagctggaagcctggatag	ggatgtcgtgtgacctctg	215-395	0.5 µl	65°C	85.0°C
P27	NM_009875	gcctgactcgtcagacaatc	ttacgtctggcgtcgaaggc	921-113	0.5 µl	65°C	87.0°C
<i>Gènes de sénescence</i>							
P21	NM_001111099.2	ttgtcgtctgttgcactct	atctgccttggagtgatag	465-588	0.5 µl	65°C	87.0-87.5°C
P16	NM_009877.2	gtgttccgctgggtgtctt	ctctgtccctcccgtgatt	547-787	1.0 µl	65°C	89.0°C
P53	NM_001127233.1	acatgacggaggtcgtgaga	taaggataggtcggcggttc	651-905	0.5 µl	63°C	87.5°C
<i>Gènes d'autophagie</i>							
Map1lc3b	NM_001364358.1 var 2	gaagtgatcgtcgcggaggt	cggatgagccggacatcttc	37-158	0.5 µl	65°C	89.0°C
Atg5	NM_053069.6 var 1	agctgcacacacttggagat	ggttccagcattggctcta	936-1051	1.0 µL	63.0°C	84.0°C
Becn1	NM_001359820.1 var 3	tggagaaccaggtgcgctac	catggagcagcagcactgtc	968-1165	0.5 µl	65.0°C	86.0°C
<i>Gènes du métabolisme énergétique</i>							
AP2	NM_024406.2	ggaacctggaagctgtgtctc	ttcctgtcgtctgcggatgat	250-456	0.5 µl	63°C	84.5-85.0°C
Apeline	NM_013912.3	gctgctctgctctccttga	ggccagtcctcgaagtctt	380-502	1-0.5 µl	63°C	85.5°C
Lept-R	NM_146146.2	ggaagacactgcttcagta	ggcagaggcgaatcatctat	875-1076	1.0µl	63°C	81.5-82.0°C
Lipocaline2	NM_00849.1	cagcaccatctatgagctac	gctccttggttcttcatac	238-518	1.0µl	65°C	86.0°C
PPARγ2	NM_001127330.1 ou NM_011146.3	tccgtgatggaagaccactc	ccacagactcggcactcaat	554-831	1 µl	60°C	82.5°C
<i>Gènes d'inflammation</i>							
TNFα	NM_013693.3	gaactggcagaagaggcact	ggccatagaactgatgagag	198-392	0.5 µl	63°C	87.0°C
IL-6	NM_031168.2	cggagaggagacttcacaga	ctccaggtagctatggact	169-453	1.0 µL	63°C	81.5-82.0°C
<i>Gènes de l'angiogenèse</i>							
Jagged 1	NM_013822.4	taccaccactgcgaagtga	gttctctcgcagctgttga	1778-1982	1.0 µl	60°C	87.0°C
Notch1	NM_008714.3	gctgtgttgtgtcctctgaa	tgcctctgcctcctgttga	6361-6549	1.0µl	63°C	87.5-88°C
<i>Gènes de différenciation ostéoblastique</i>							
Runx2	NM_00145920.2	gacactgccacctctgactt	gcaggctacgtgtgtgtgta	2020-2260	0.5 µl	63°C	88.0°C
Osterix	NM_130458.3	atggcgtcctctctgtctg	aaggctcagctatggcttct	38-190	1.0 µl	60°C	87.5°C

7. Protocoles des analyses ELISA

7.1 Collecte des sérums

Matériel

- Tubes collecteurs SST 600 µL BD Microtainer® #365968 (BD, Franklin Lakes, New Jersey, USA)
- Centrifugeuse

Protocole

Dues aux variations basales des niveaux d'hormones au cours de la journée, le sang des souris a été récolté de manière constante entre 9 et 11h du matin au jour final du protocole. Tous les échantillons sanguins sont collectés immédiatement après l'euthanasie de la souris (5% isoflurane).

- Décapiter la souris et récolter le sang dans un tube collecteur.
- Inverser à plusieurs reprises le tube et incubé minimum 30 min à température ambiante.
- Centrifuger 10 min à 2000g.
- Collecter le surnageant et le déposer dans un tube Eppendorf protein low-bind.
- Stocker les échantillons sériques à -80°C jusqu'à analyse.

7.2 Dosages ELISA

Notes concernant l'ensemble des protocoles ELISA

- Les réactifs sont déposés à l'aide d'une pipette automatique.
- Les étapes de lavages s'effectuent de la manière suivante :
 1. Retourner fermement la plaque au-dessus d'un évier afin de vider les puits
 2. Déposer à l'aide d'une pipette multicanaux 200 µL/puit de tampon de lavage (*Wash Solution*)
 3. Retourner fermement la plaque au-dessus d'un évier afin de vider les puits
Répéter les étapes 2 et 3 le nombre de fois indiqué dans le protocole
 4. Tapoter la plaque sur du papier absorbant pour éliminer l'excédent
 5. Aspirer le reste de liquide dans les puits.
- Tous les réactifs et échantillons doivent être vortexés avant d'être déposés.
- Tous les réactifs doivent être réchauffés à température ambiante avant utilisation.

7.2.1 Dosage sérique de la testostérone.

Matériel

- Thermo Scientific Multiskan Spectrum (Thermo Fisher Scientific, Etats-Unis).
- Kit ELISA testostérone souris/rat ALPCO #55-TESTMS-E01 (Alpco, Etats-Unis).
- Eau stérile Versylene® Fresenius (Fresenius Kabi, Allemagne).

Principe

Ce kit ELISA est basé sur le principe de liaison compétitive. Une quantité inconnue de testostérone présente dans l'échantillon et une quantité connue de testostérone conjuguée à de l'HRP (horseradish peroxidase) sont en compétition pour les sites de liaison anti-testostérone coatés dans les puits de la plaque. Après une heure d'incubation sur un agitateur, les substances non liées sont évacuées par un lavage et une solution contenant le substrat chromogène TMB (tetramethylbenzidine) est ajoutée. L'HRP présente catalyse alors le TMB en composé coloré. La réaction est stoppée par une solution d'acide hydrochlorique. La concentration de testostérone est alors inversement proportionnelle à l'absorbance mesurée.

Préparation des réactifs et échantillons

- *Wash solution* : diluer 50 mL de *Wash buffer* pur dans 450 mL d'eau stérile pour un volume final de 500mL.
- Echantillons : les sérums sont utilisés purs.

Protocole

- Déposer en duplicat 10 µL de chaque calibrateur et échantillon dans les puits appropriés.
- Déposer 100 µL/puit d'*Incubation Buffer*.
- Déposer 50 µL/puit d'*Enzyme Conjugate* dans chaque puit.
- Couvrir la plaque avec un film adhésif, incuber 60 min à température ambiante sous agitation.
- Effectuer 4 lavages avec la *Wash Solution*.
- Déposer 200 µL/puit de *Substrate Solution*.
- Couvrir la plaque avec un film adhésif, incuber 30 min à température ambiante, à l'obscurité et sous agitation.
- Déposer 50 µL/puit de *Stop Solution*.
- Mesurer l'absorbance à 405 et 450 nm dans les 15 min.
-

Calcul des résultats

Les valeurs d'absorbance (DO) en fonction de la concentration de testostérone des standards sont modélisées par une fonction régression linéaire pour un R^2 de 0.9922. Les concentrations inconnues de testostérone des échantillons sont transposées à partir de cette fonction :

$$Y = aX + b$$

a : pente

b : ordonnée à l'origine

X : $\log[\text{testostérone-HRP}]$

Y : DO_{450} brute

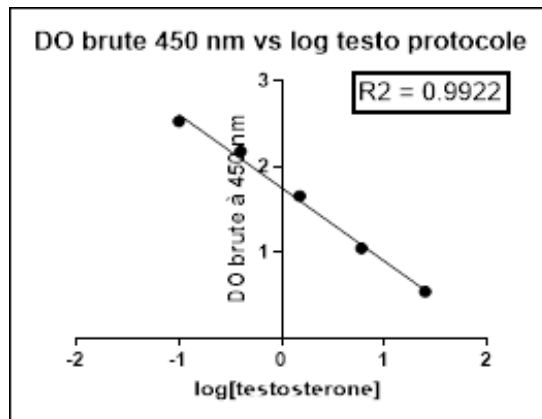


Figure 4 : Courbe d'étalonnage du dosage ELISA de la testostérone.

7.2.2 Dosage sérique de la corticostérone.

Matériel

- Thermo Scientific Multiskan Spectrum (Thermo Fisher Scientific, Etats-Unis).
- Kit ELISA corticostérone #AC-14F1 (ids, Angleterre).
- Eau sterile Versylene® Fresenius (Fresenius Kabi, Allemagne).

Principe

Ce kit ELISA corticostérone est un dosage immunoenzymologique compétitif utilisant des anticorps primaires anti-corticostérone coâtés sur la surface interne des puits. Les calibrateurs, contrôles et échantillons sont incubés avec de la corticostérone conjuguée à une enzyme HRP. Il y a alors une compétition de liaison entre la corticostérone des échantillons et la corticostérone conjuguée à une enzyme HRP. Les puits sont lavés et colorés avec le substrat chromogénique TMB. La réaction est stoppée avec une solution d'acide hydrochlorique. L'intensité de la couleur est alors inversement proportionnelle à la concentration de corticostérone.

Préparation des réactifs et échantillons

- Calibrateurs et contrôles : reconstituer chaque vial avec 1mL d'eau stérile.
- *Enzyme conjugate*: ajouter le contenu entier du vial *Buffer* au vial *Enzyme Conjugate*.

- *Wash solution* : diluer 20 mL de *Wash Concentrate* dans 950 mL d'eau stérile.
- Echantillons : les sérums sont dilués au 1/20^e soit 15 µL de sérum pur dans 285 µL de *Sample Diluent*.

Protocole

- Déposer en duplicat 100 µL de chaque calibrateur, contrôle, et échantillon dans les puits appropriés.
- Déposer 100 µL/puit d'*Enzyme Conjugate*.
- Couvrir la plaque avec un film adhésif et incuber 16-24h à 2-8°C
- Effectuer 3 lavages avec la *Wash Solution*.
- Déposer 200 µL/puit de *TMB Substrate*.
- Couvrir la plaque avec un film adhésif et incuber 30 min à température ambiante et à l'obscurité.
- Déposer 100 µL/puit de *Stop Solution*.
- Mesurer l'absorbance à 405, 450 et 650 nm dans les 30 min.

Calcul des résultats

Les valeurs d'absorbance (DO) en fonction de la concentration de corticostérone des standards sont modélisées par une fonction régression non linéaire avec une courbe dose-réponse à 4 paramètres pour un R² de 0.9929. Les concentrations inconnues de corticostérone des échantillons sont transposées à partir de cette fonction :

$$Y = Bottom + \frac{Top - Bottom}{1 + 10^{((\log IC50 - X) * h)}}$$

IC50: concentration inhibitrice médiane du composé agoniste (corticostérone_{calibrateur})

h : pente

Bottom : réponse minimale

Top : réponse maximale

Y : [composé marqué] = [corticostérone-HRP] =

DO₄₅₀ brute

X : log [agoniste] = log [corticostérone_{calibrateur}]

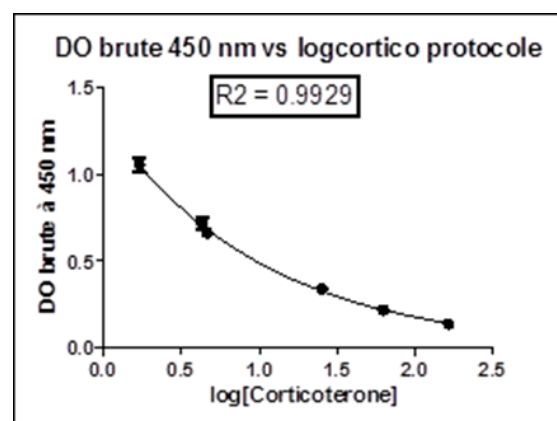


Figure 5 : Courbe d'étalonnage du dosage ELISA de la corticostérone.

7.2.3 Dosage sérique de CTX-1.

Matériel

- Thermo Scientific Multiskan Spectrum (Thermo Fisher Scientific, Etats-Unis).
- Kit ELISA CTX-I RatLaps #AC-06F1 (ids, Angleterre).
- Eau stérile Versylene® Fresenius (Fresenius Kabi, Allemagne).

Principe

Ce kit ELISA repose sur le principe de compétition de liaison. Ce dosage nécessite une pré-incubation de la plaque streptavidiné avec un antigène CTX-I biotinylé. Les échantillons/calibrateurs sont ensuite incubés en présence d'un anticorps primaire anti- CTX1. Il y a alors une compétition de liaison pour ces anticorps primaires entre les antigènes CTX-I biotinylés fixés et les antigènes CTX-I solubles des échantillons. Une enzyme HRP anti-IgG est ensuite ajoutée pour lier les anticorps primaires anti-CTX-I puis le substrat chromogénique TMB est ajouté pour développer la couleur. La réaction est stoppée avec l'addition d'une solution d'acide sulfurique. L'intensité de la couleur est alors inversement proportionnelle à la concentration de CTX-I dans les échantillons.

Préparation des réactifs et échantillons

- *Wash Solution*: diluer 10 mL de *Wash Buffer* pur dans 490 mL d'eau stérile.
- Echantillons : les sérums sont utilisés purs.

Protocole

- Déposer 100 µL/puit de *Biotinylated RatLaps Antigen*.
- Couvrir la plaque avec un film adhésif, incuber 30 min à température ambiante.
- Effectuer 5 lavages avec la *Wash Solution*.
- Déposer en duplicat 20 µL de standard, contrôle et échantillon dans les puits respectifs.
- Déposer 100 µL/puit de *Primary Antibody*.
- Couvrir la plaque avec un film adhésif, incuber 18 h à 2-8°C.
- Effectuer 5 lavages avec la *Wash Solution*.
- Déposer 100 µL/puit de *Peroxidase conjugated anti-IgG*.
- Couvrir la plaque avec un film adhésif, incuber 60 min à température ambiante.
- Effectuer 5 lavages avec la *Wash Solution*.
- Déposer 100 µL/puit de *Substrate TMB*.
- Couvrir la plaque avec un film adhésif, incuber 30 min à l'obscurité et à température ambiante.
- Déposer 100µL/puit de *Stopping solution*.

- Mesurer l'absorbance à 405, 450 et 650 nm.

Calcul des résultats

Les valeurs d'absorbance (DO) à 450 nm en fonction de la concentration de CTX-I des standards sont modélisées par une fonction régression non linéaire avec une équation One site - Fit logIC50 pour un R² de 0.9960. Les concentrations inconnues de CTX-I des échantillons sont transposées à partir de cette fonction :

$$Y = Bottom + \frac{Top - Bottom}{1 + 10^{(X - \text{LogIC50})}}$$

IC50: concentration inhibitrice médiane du composé compétiteur (CTX-I_{calibrateur})

h : pente

Bottom : Y min

Top : Y max

Y : [composé marqué] = [CTX-I_{biotinylé}] = DO₄₅₀ brute

X : log [compétiteur] = log [CTX-I_{calibrateur}]

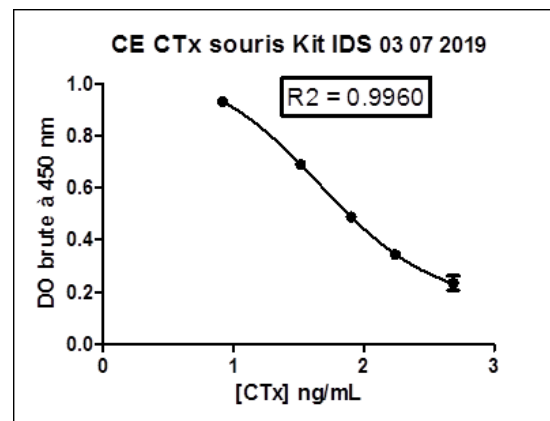


Figure 6 : Courbe d'étalonnage du dosage ELISA de CTX-I.

7.2.4 Dosage sérique de la leptine.

Matériel

- Thermo Scientific Multiskan Spectrum (Thermo Fisher Scientific, Etats-Unis).
- Kit Quantikine ELISA Mouse/Rat Leptin Immunoassay #MOB00 (R&D Systems, Etats-Unis).
- Eau stérile Versylene® Fresenius (Fresenius Kabi, Allemagne).

Principe

Ce kit emploie la technique quantitative d'ELISA en sandwich. Un anticorps spécifique à la leptine de souris/rat est pré-coatée à l'intérieur de la plaque. Les standards, contrôles et échantillons sont déposés dans les puits, toute leptine présente se fixe alors aux anticorps spécifiques coatés. Après un lavage, toutes les substances non liées sont évacuées et un anticorps conjugué à une enzyme HRP est ajouté aux puits. Les anticorps non liés sont évacués par un lavage et une solution de substrat (TMB) est ajoutée. La réaction enzymatique de la peroxidase rend un produit bleu qui devient jaune lorsque la solution

d'acide hydrochlorique est ajoutée pour stopper la réaction. L'absorbance mesurée est alors proportionnelle à la quantité de leptine liée dans l'étape initiale.

Préparation des produits et échantillons

- Contrôle : reconstituer avec 1mL d'eau stérile.
- Standard mère (4000 pg/mL) : reconstituer avec le vial entier de *Calibrator Diluent RD5-3*.
- Points étalons : effectuer 6 dilutions successives à partir du standard mère (4000 pg/mL) de demi en demi avec 200 μ L de standard dilué dans 200 μ L de *Calibrator Diluent RD5-3* jusqu'à obtenir une concentration de 65.5 pg/mL.
- *Wash Solution*: diluer 16 mL de *Wash Buffer* pur dans 384 mL d'eau stérile.
- *Substrate Solution*: mélanger les *Color reagents A* et *B* en volumes égaux dans les 15 minutes précédant le dépôt.
- Échantillons : les sérums sont dilués au 1/20^e soit 10 μ L de sérum pur dans 190 μ L *Calibrator Diluent RD5-3*.

Protocole

- Déposer 50 μ L/puit d'*Assay Diluent RDIW*.
- Déposer en duplicat 50 μ L/puit de standard, contrôle ou sérum dilué dans les puits respectifs.
- Agiter la plaque pour une minute.
- Couvrir la plaque avec un film adhésif, incuber 2h à température ambiante.
- Effectuer 5 lavages avec la *Wash Solution*.
- Déposer 100 μ L/puit de *Leptin Conjugate*.
- Couvrir la plaque avec un film adhésif, incuber 2h à température ambiante et à l'obscurité.
- Effectuer 5 lavages avec la *Wash Solution*.
- Déposer 100 μ L/puit de la *Substrate Solution*.
- Couvrir la plaque avec un film adhésif, incuber 30min à température ambiante et à l'obscurité.
- Déposer 100 μ L/puit de *Stop Solution*.
- Agiter la plaque pour une minute.
- Lire l'absorbance à 405, 450 et 550 nm dans les 30 min.

Calcul des résultats

Les valeurs d'absorbance (DO) à 450 nm en fonction de la concentration de leptine des standards sont modélisées par une fonction régression non linéaire avec une équation sigmoïde allostérique pour un R²

de 1.000. Les concentrations inconnues de leptine des échantillons sont transposées à partir de cette fonction :

$$Y = \frac{V_{max} * X^h}{Khalf^h + X^h}$$

Y = vitesse enzymatique = DO₄₅₀ corrigée

X = [substrat] = [leptine]

Khalf : concentration du substrat produit à la vitesse enzymatique semi-maximale

V_{max} : vitesse maximale

h : pente

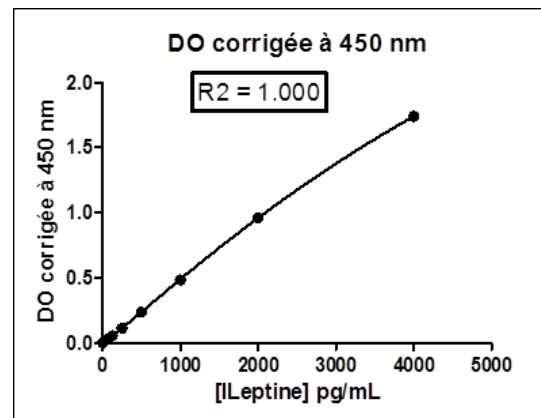


Figure 7 : Courbe d'étalonnage du dosage ELISA de la leptine.

7.2.5 Dosage sérique de l'IGF-1.

Matériel

- Thermo Scientific Multiskan Spectrum (Thermo Fisher Scientific, Etats-Unis).
- Kit RayBio® Mouse IGF-1 #ELM-IGF1 (RayBiotech, Etats-Unis).
- Eau stérile Versylene® Fresenius (Fresenius Kabi, Allemagne).

Principe

Ce kit repose sur le principe de l'ELISA sandwich. Les standards, contrôles et échantillons sont déposés, l'IGF-1 qu'ils contiennent se fixent aux anticorps spécifiques préalablement coatés. Les substances non fixées sont évacuées par un lavage et une solution d'anticorps primaires biotinylés anti-IGF-1 est ajoutée. Ces anticorps se lient aux antigènes IGF1 fixés. Les puits sont lavés et une solution de streptavidine conjuguée à de l'HRP est ajoutée aux puits. Les streptavidines conjuguées se lient alors à la biotine des anticorps primaires. L'ajout de la solution substrat TMB permet le développement de la couleur sous l'action de l'enzyme HRP. Une solution d'acide sulfurique stoppe la réaction et change la couleur bleue en jaune. L'intensité de la couleur est proportionnelle à la quantité d'IGF-1 initialement fixée.

Préparation des réactifs et échantillons

- Working Assay Diluent B 1X : diluer 10 mL d'Assay Diluent B dans 40 mL d'eau stérile.
- Wash Solution: diluer 15 mL de Wash Buffer Concentrate 20X dans 285 mL d'eau stérile.
- Solution mère (2000 pg/mL) : reprendre le vial Standard Protein dans 400 µL d'Assay Diluent A. Rediluer le mélange au 1/20e avec 20 µL de solution mère dans 980 µL d'Assay Diluent A.

- Standards : à partir de la solution mère (2000 pg/mL), effectuer des dilutions de 1/3 en 1/3 soit 200 µL d'une dilution dans 400 µL d'Assay Diluent A jusqu'à obtenir la concentration de 2.74 pg/mL.
- Biotinylated Antibody : reprendre chaque vial de Detection Antibody IGF-1 avec 100 µL de Working Diluent B 1X puis diluer ce mélange au 1/80: 100 µL de chaque vial Detection Antibody IGF-1 dans 7.9 mL de Working Diluent B 1X.
- HRP-Streptavidin: diluer 70 µL d'HRP-streptavidin Concentrate dans 14 mL de Working Diluent B 1X.
- Echantillons: les sérums sont dilués au 1/20e soit 15 µL de sérum pur dans 285 µL d'Assay Diluent A.

Protocole

- Déposer en duplicat 100µL/puit de standard ou échantillon dans les puits respectifs.
- Couvrir la plaque avec un film adhésif, incuber 2h30 à température ambiante sous légère agitation.
- Effectuer 4 lavages avec la Wash Solution.
- Déposer 100 µL/puit de Biotinylated Antibody dilué.
- Couvrir la plaque avec un film adhésif, incuber 60 min à température ambiante sous légère agitation et à l'obscurité.
- Effectuer 4 lavages avec la Wash Solution.
- Déposer 100 µL/puit de HRP-streptavidin dilué.
- Couvrir la plaque avec un film adhésif, incuber 45 min à température ambiante sous légère agitation et à l'obscurité.
- Effectuer 4 lavages avec la Wash Solution.
- Déposer 400 µL/puit de TMB substrate.
- Couvrir la plaque avec un film adhésif, incuber 30 min à température ambiante sous légère agitation et à l'obscurité.
- Déposer 50 µL/puit de Stop Solution.
- Lire l'absorbance à 405 et 450 nm immédiatement.

Calcul des résultats

Les valeurs d'absorbance à 450 nm en fonction de la concentration d'IGF-1 des standards sont modélisées par une régression non linéaire avec une courbe sigmoïde allostérique pour un R² de 0.9996. Les concentrations inconnues d'IGF-1 des échantillons sont transposées à partir de cette fonction :

$$Y = \frac{V_{max} * X^h}{Khalf^h + X^h}$$

Y = vitesse enzymatique = DO_{450} corrigée

X = [substrat] = [IGF-1]

K_{half} : concentration du substrat produit à la vitesse enzymatique semi-maximale

V_{max} : vitesse maximale

h : pente

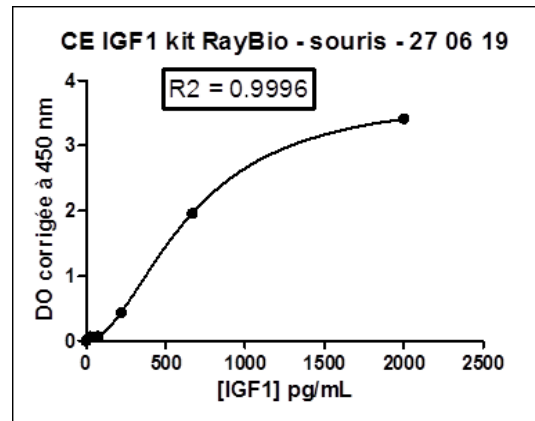


Figure 8 : Courbe d'étalonnage pour le dosage ELISA de l'IGF1.

7.2.6 Dosage sérique de l'irisine.

Matériel

- Thermo Scientific Multiskan Spectrum (Thermo Fisher Scientific, Etats-Unis).
- Kit Mouse FNDC5/Irisin ELISA #LS-F23848 (LSBioSciences, Etats-Unis).
- Eau stérile Versylene® Fresenius (Fresenius Kabi, Allemagne).

Principe

Ce kit est basé sur le principe d'ELISA sandwich. Chaque puit de la plaque est pré-coaté avec des anticorps spécifiques à l'irisine. Les standards et les échantillons sont ajoutés aux puits, l'irisine qu'ils contiennent se fixe aux anticorps coatis. Après une étape de lavage qui évacue les antigènes non liés, une solution d'anticorps biotinylés est ajoutée, ces anticorps se lient aux antigènes irisine. Un complexe streptavidine-HRP est ajouté, qui se fixe à la biotine des anticorps secondaires. Après un lavage, du substrat TMB est ajouté et réagit avec l'enzyme HRP résultant en une production de couleur. Une solution d'acide sulfurique stoppe la réaction. L'intensité de la couleur est alors proportionnelle à la quantité d'irisine présente dans les échantillons.

Préparation des réactifs et échantillons

- Standard mère (4000 pg/mL) : reconstituer un vial de standard mère avec 1mL de Sample Diluent.
- Standards étalons : à partir du standard mère (4000 pg/mL) effectuer des dilutions successives de 2000 à 62.5 pg/mL soit 300 μ L de solution standard + 300 μ L de Sample Diluent.
- Wash Solution : diluer 16 mL de Wash Buffer 25X pur dans 384 mL d'eau stérile.
- Biotinylated Detection Antibody Diluent: diluer au 1/100 soit 120 μ L de Biotinylated Detection Antibody (100X) dans 12 mL Biotinylated Detection Antibody Diluent.

- HRP Conjugate Diluent : dilution au 1/100e soit 120 μL de HRP Conjugate (100X) dans 12 mL d'HRP Conjugate Diluent.
- Echantillons : les sérums sont dilués au $\frac{1}{4}$ soit 75 μL de sérum pur dans 225 μL de Sample Diluent.

Protocole

- Déposer en duplicat 100 μL /puit de standard ou sérum dilué dans les puits respectifs.
- Couvrir la plaque avec un film adhésif, incuber 90 min à 37°C.
- Vider le contenu de la plaque et aspirer l'excédent.
- Déposer 100 μL /puit de Biotinylated Detection Antibody Diluent.
- Couvrir la plaque avec un film adhésif, incuber 60 min à 37°C sous légère agitation.
- Effectuer 3 lavages avec la Wash Solution.
- Déposer 100 μL /puit de la solution HRP Conjugate Diluent
- Couvrir la plaque avec un film adhésif, incuber 30 min à 37°C
- Effectuer 5 lavages avec la Wash Solution.
- Déposer 90 μL /puits de TMB Substrate.
- Couvrir la plaque avec un film adhésif, incuber 15 min à 37°C et à l'obscurité.
- Déposer 50 μL /puit de Stop Solution.
- Lire l'absorbance à 405 et 450 nm immédiatement.

Calcul des résultats

Les valeurs d'absorbance à 450 nm en fonction de la concentration d'irisine des standards sont modélisées par une régression non linéaire sigmoïde allostérique pour un R^2 de 0.9968. Les concentrations inconnues d'irisine des échantillons sont transposées à partir de cette fonction :

$$Y = \frac{V_{max} * X^h}{Khalf^h + X^h}$$

Y = vitesse enzymatique = DO₄₅₀ corrigée

X = [substrat] = [irisine]

Khalf : concentration du substrat produit à la vitesse enzymatique semi-maximale

V_{max} : vitesse maximale

h : pente

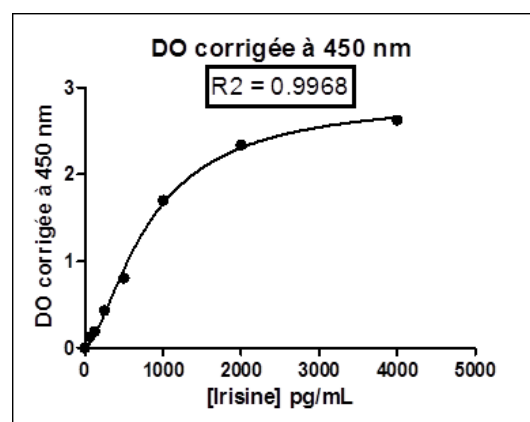


Figure 9 : Courbe d'étalonnage du dosage ELISA de l'irisine.

8. Protocoles d'analyses de la densité ostéocytaire et des lacunes vides

8.1 Coupe des rings et coloration DAPI

Matériel

- scie diamantée de précision (Escil, Chassieu, France).
- vacuum.

Produits

- Acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA) #E5134 (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri, Etats-Unis).
- Ethanol 100%
- DAPI
- Alcool benzylique #402834 (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri, Etats-Unis).
- Benzyl benzoate #818701 (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri, Etats-Unis).

Préparation des solutions

- Solution DAPI 1:100, diluée dans de l'eau distillée.
- Solutions éthanol 50%, 75%, 100%, diluée dans de l'eau distillée.
- Transparisateur : 13,2 mL d'alcool benzylique + 106,8 mL de benzyl benzoate.

Protocole

- A l'aide de la scie diamantée de précision, effectuer des coupes transversales « ring » de 400 µm d'épaisseur.
- Incuber les rings dans de l'EDTA, pendant une nuit à 4°C.
- Jeter l'EDTA et incuber les rings dans la solution DAPI 1:100 sous vacuum 60 min à l'obscurité.
- Jeter la solution DAPI et incuber les rings dans de l'éthanol 50% sous vacuum 15 min à l'obscurité.
- Jeter l'éthanol 50% et incuber les rings dans de l'éthanol 75% sous vacuum 15 min à l'obscurité.
- Jeter l'éthanol 75% et incuber les rings dans de l'éthanol 100% sous vacuum 15 min à l'obscurité.
- Jeter l'éthanol 100% et incuber les rings dans le transparisateur sous vacuum 15 min à l'obscurité.

- Stocker les rings dans le transparisateur à l'obscurité à 4°C, maximum 3 jours.

8.2 Acquisitions des images rings DAPI

Matériel

- Microscope confocal 800 Airyscan (Carl Zeiss, Oberkochen, Allemagne).
- Logiciel ZEN (Carl Zeiss, Oberkochen, Allemagne).

Paramètres d'acquisition

Image dimensions	
Z-stack	50 slices (98µm)
Tiles	2 Tiles
Scaling (per pixel)	0.198 µm x 0.198 µm x 2.000 µm
Image size (pixel)	1967 x 1013
Image size (scaled)	389,61x200,65
Bit Depth	16 bit

Informations d'acquisition	
Objectif	Plan-Apochromat 63x/1.40 Oil DIC M27
Contrast Mode	Fluorescence
Pinhole	7.08 AU/267 µm
Laser Wavelength	405nm: 2%
Scan Zoom	X:0,5 Y:0,5
Pixel Time	4,12µs
LSM Scan Speed	5ms
Scan Direction	Bidirectional
Excitation Wavelength	353
Emission Wavelength	465

Detection Wavelength	400-499
Detector gain	840V
Detector Digital Gain	1.0
Airyscan Mode	Airyscan SR:0.7 (2D, Auto)
Processing	Stitching

8.3 Analyses des images rings DAPI

Les images sont directement analysées sur le logiciel ZEN.

Sur chaque stack/acquisition des aires sont manuellement définies de manière à inclure l'ensemble de l'épaisseur du cortex et excluant le périoste et l'espace médullaire, ainsi qu'à obtenir une aire totale d'analyse de 20 000 μm^2 pour le cortex postérieur et de 40 000 μm^2 pour le cortex antérieur (Fig.10).

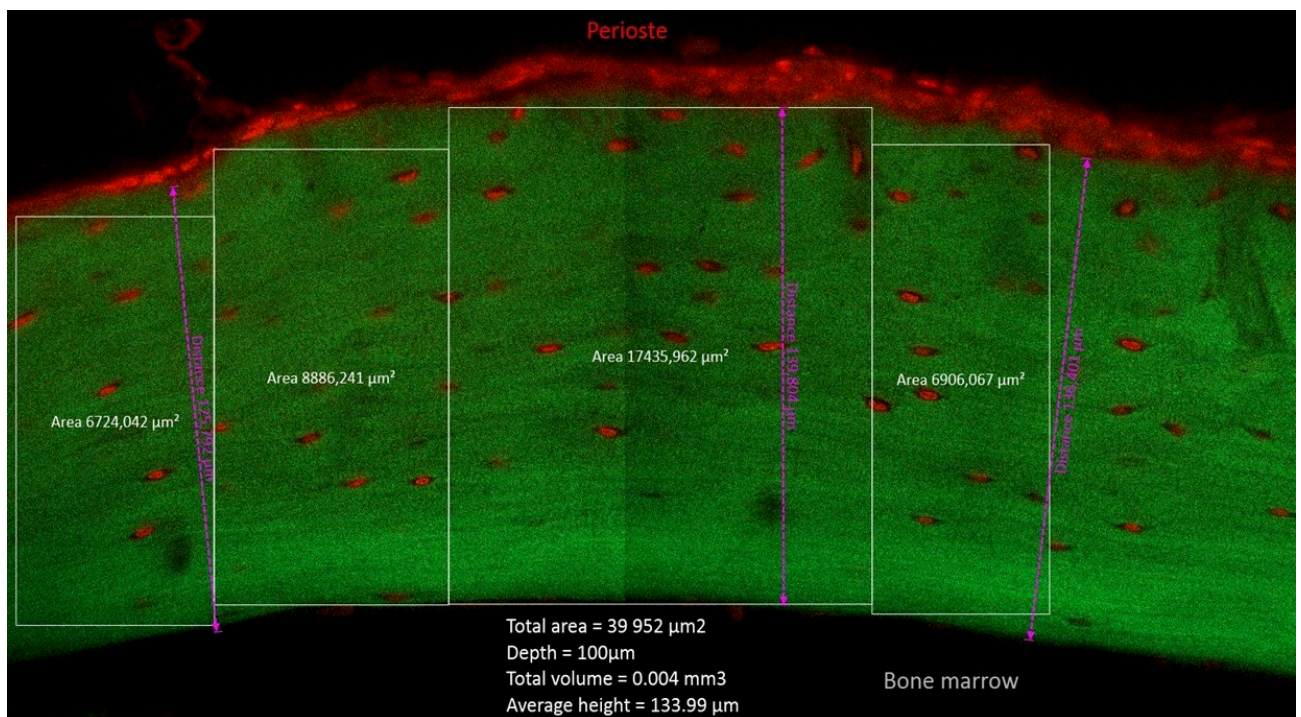


Figure 10 : Illustration des zones analysées au niveau du cortex antérieur.

Chaque aire définie est analysée individuellement, les 50 images du stack sont visionnées une par une et le nombre de noyaux marqués au DAPI et de lacunes vides sont comptés manuellement à l'aide d'un compteur de cellules.

9. Protocoles des analyses du réseau lacuno-canaliculaire et ostéocytaire

9.1 Coloration DIL-Fluorescéine

Matériel

- vacuum.

Produits

- 1,1'-Dioctadecyl-3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate « DIL » (#42364, Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, Etats-Unis).
- Fluorescéine sodique “fluorescéine” (#F6377, Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, Etats-Unis).
- Diméthyl Sulfoxide « DMSO » (#D5879, Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, Etats-Unis).
- Alcool benzylique #402834 (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, Etats-Unis).
- Benzyl benzoate #818701 (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, Etats-Unis).
- Ethanol 100%.

Préparation des solutions

- solution fluorescéine 0,2% : 2g de fluorescéine diluée dans 1L d'éthanol 100%.
- solution DIL 10% : 10µL de DIL dilué dans 90 µL de DMSO.
- solution DIL-Fluorescéine : 1/5^{ème} solution DIL 10%, 4/5^{ème} solution Fluorescéine 0,2%.
- Transparisateur : 13,2 mL d'alcool benzylique + 106,8 mL de benzyl benzoate.

Protocole

- incuber les rings 3h sous vacuum dans la solution DIL-Fluorescéine.
- effectuer deux rinçages rapides à l'éthanol 100%.
- incuber les rings 30 min sous vacuum dans le transparisateur.
- effectuer les acquisitions des images dans la journée.

9.2 Acquisitions des images DIL-Fluorescéine

Matériel

- Microscope confocal 800 Airyscan (Carl Zeiss, Oberkochen, Allemagne).
- Logiciel ZEN (Carl Zeiss, Oberkochen, Allemagne).

Paramètres d'acquisition

Image dimensions	
Z-stack	6 slices (50 µm)
Tiles	2 Tiles
Scaling (per pixel)	0,124 µm x 0,124 µm x 10 µm
Image size (pixel)	1916 x 1002
Image size (scaled)	237,19 µm x 124,04 µm
Bit Depth	16 Bit

Informations d'acquisition		
Objectif	Plan-Apochromat 63x/1.40 Oil DIC M27	
Contrast Mode	Fluorescence	
Track	Fluorescéine	DIL
Pinhole	6.02 AU/197 µm	5.33 AU/197 µm
Laser Wavelength	488nm: 0,3%	561nm: 3.50 %
Scan Zoom	X:0,8 Y:0,8	X:0,8 Y:0,8
Pixel Time	32,97µs	32,97µs
LSM Scan Speed	2ms	2ms
Scan Direction	Bidirectional	Bidirectional
Excitation Wavelength	493	577
Emission Wavelength	517	603
Detection Wavelength	497-566	565-635
Detector gain	800V	800V
Detector Digital Gain	1.0	1.0
Airyscan Mode	Airyscan SR: 4.1 (2D, Auto)	Airyscan SR: 4.1 (2D, Auto)
Processing	Stitching + stack correction	Stitching + stack correction

9.3 Analyse des images DIL-Fluorescéine

Logiciel

- Image J 1.53c

Protocole Image J – correction des images et création d’une séquence d’image

- ouvrir le stack.czi dans Image J (Plugin Bio-formats).
- ajuster la luminosité et/ou le contraste de manière linéaire : Image > Adjust > Brightness/Contrast
- ajuster la luminosité et/ou le contraste de manière non linéaire : Process > Math > Gamma
- sauvegarder le stack Fluorescéine et le stack DIL sous forme d’une séquence d’images individuelles au format .tif : File > Save As > Image Sequence

Protocole Image J – segmentation

- ouvrir une image de la séquence au format .tif dans Image J
- ouvrir l’outil *Trainable Weka Segmentation* : Plugins > Segmentation > Trainable Weka Segmentation
- charger le modèle de segmentation enregistré : > Load classifier
- créer un aperçu de la segmentation effectué : > Create Result
- obtenir les images segmentées *probability maps* : > Get probability

Protocole Image J – Analyse des probability maps

- Diviser le stack *probability maps* en images individuelles : Image > Stack > Stack to Images
- Fermer la probability map *background*
- Binariser la probability map « lacunes » : Process > Binary > Make Binary
- Analyser les particules de la probability map « lacunes » : Analyse > Analyze Particles ; avec les options suivantes : size (μm^2) : 10-60, circularity : 0.2–1.0, show : outlines, « display results », « exclude on edges », « clear results », « include holes », « summarize », > ok

La fenêtre *Summary* présente les résultats suivants :

- Count : nombre de particules (lacunes) détectées
- Total Area (μm^2) : aire totale de l’ensemble des particules
- Average size (μm^2) : aire moyenne d’une particule
- %Area : aire totale de l’ensemble des particules rapportée à l’aire de l’image

- Sauvegarder la fenêtre de résultats *Summary* sous format .txt : File > Save As
- Fermer la probability map *lacunes*

- Binariser la probability map *canaliculi*: Process > Binary > Make Binary
- Analyser l'aire des canalicules: Analyse > Set Measurements > sélectionner « Area » et « Area Fraction » > ok > Analyse > Measure

La fenêtre *Results* présente l'aire totale de l'image en μm^2 « Area » et la fraction de l'aire des canaliculi « %Area ».

- Sauvegarder la fenêtre *Results* au format .txt : File > Save As
- « Squelettoniser » la probability map *canaliculi* binarisé : Process > Binary > Skeletonize
- Analyser le squelette de l'image : Analyze > Skeleton > Analyze Skeleton (2D/3D) ; sélectionner les options suivantes : prune cycle method « none », « show detailed info », > ok

La fenêtre *Branch Information* présente dans la deuxième colonne la longueur de chaque branche détectée en μm , il faut effectuer la somme de cette colonne pour obtenir la longueur totale des canalicules/dendrites. Soit en copiant-collant les données dans Excel, ou en demandant à Image J d'effectuer cette somme et d'imprimer le résultat dans la fenêtre *Log* avec le code Macro Image J suivant :

```

64 sumc = 0;
65 selectWindow("Branch information");
66 lines1 = split(getInfo(), "\n");
67 headings = split(lines1[0], "\t");
68 for (j=1; j<lines1.length; j++) {
69     values = split(lines1[j], "\t");
70     c = values [1];
71     sumc=sumc + c;
72 }
73 namec="Sum branch length "+sumc;
74 print (namec);

```

- Sauvegarder le résultat imprimé dans la fenêtre *Log* au format .txt : File > Save As

La fenêtre *Results* indique le nombre de branches (*#Branches*) et de jonctions (*#Junctions*) par réseau détecté, afin d'obtenir le nombre total, il faut effectuer la somme de ces deux colonnes de résultats. Soit en copiant-collant dans Excel, ou en demandant à Image J d'effectuer cette somme et d'imprimer le résultat dans la fenêtre *Log* avec le code Macro Image J suivant :

```

45 suma = 0;
46 sumb = 0;
47
48 selectWindow("Results");
49 lines1 = split(getInfo(), "\n");
50 headings = split(lines1[0], "\t");
51 for (j=1; j<lines1.length; j++) {
52     values = split(lines1[j], "\t");
53     a = values[0];
54     b = values[1];
55     suma = suma + a;
56     sumb = sumb + b;
57 }
58 print (name);
59 namea= "Sum nb branches "+ suma;
60 nameb= "sum nb junctions "+ sumb;
61 print (namea);
62 print (nameb);

```

- Sauvegarder le résultat imprimé dans la fenêtre *Log* au format .txt : File > Save As

9.4 Macros Image J pour les analyses des images DIL-Fluorescéine

Macro Image J – segmentation (language IJ1 Macro)

```

open("C:/Users/pel05144/Desktop/Rings DIL-Fluoréscéine/Images sequence/FLU0/28°C
14D/Ring14/Ring1401.tif");

x=1;

while(x<=8)

{
    run("Trainable Weka Segmentation");
    selectWindow("Trainable Weka Segmentation v3.2.33");
    wait(2000);
    call("trainableSegmentation.Weka_Segmentation.loadClassifier",
"C:/Users/pel05144/Desktop/Rings DIL-Fluoréscéine/Classifiers/classifieurTESTgreen.model");
    wait(2000);

    call("trainableSegmentation.Weka_Segmentation.getResult");
    selectWindow("Classified image");
    name1="CI"+x;
    saveAs("tiff", "C:/Users/pel05144/Desktop/Rings DIL-Fluoréscéine/Classified
images/FLU0/28°C 14D/Ring14/"+ name1 + ".tif");
    close();

    selectWindow("Trainable Weka Segmentation v3.2.33");
    call("trainableSegmentation.Weka_Segmentation.getProbability");
    selectWindow("Probability maps");
    name2="PM"+x;
    saveAs("tiff", "C:/Users/pel05144/Desktop/Rings DIL-Fluoréscéine/Probability
maps/FLU0/28°C 14D/Ring14/"+ name2 + ".tif");
    close();

    selectWindow("Trainable Weka Segmentation v3.2.33");
    close();

    run("Open Next");
    x=x+1;
}

```

Macro Image J – analyses (language IJ1 Macro)

```

n=6;
while(n<=6)

{
    x=1;
    while(x<=6)

    {
        open("C:/Users/pel05144/Desktop/Rings DIL-Fluoréscéine/Probability maps/DIL/22°C
14D/Ring"+n+"/PM"+x+".tif");
        run("Stack to Images");
        close("background");
        selectWindow("lacune");
        run("Make Binary");
        wait(5000);
        selectWindow("lacune");
        run("Erode");
        run("Dilate");
        wait(2000);
        selectWindow("lacune");
    }
}

```

```

run("Analyze Particles...", "size=10-60 circularity=0.20-1.00 show=Outlines display exclude
clear include summarize");
name = "Stack " + x;
wait(1000);
selectWindow("Drawing of lacune");
saveAs("Tiff", "C:/Users/pel05144/Desktop/Rings DIL-Fluoréscéine/Résultats/Drawing of
particles/DIL/22°C 14D/Ring"+n+"/"+"name");
close();
close("Results");
selectWindow("Summary");
saveAs("Text", "C:/Users/pel05144/Desktop/Rings DIL-Fluoréscéine/Résultats/Lacunae and cell
bodies/DIL/22°C 14D/Ring"+n+"/"+"name");
close();

selectWindow("canaliculi");
    setOption("BlackBackground", false);
run("Make Binary");
run("Measure");
selectWindow("Results");
saveAs("Text", "C:/Users/pel05144/Desktop/Rings DIL-Fluoréscéine/Résultats/Branches
areas/DIL/22°C 14D/Ring"+n+"/"+"name");
selectWindow("canaliculi");
run("Skeletonize");
run("Analyze Skeleton (2D/3D)", "prune=none show");
close("canaliculi");

suma = 0;
sumb = 0;

selectWindow("Results");
lines1 = split(getInfo(), "\n");
headings = split(lines1[0], "\t");
for (j=1; j<lines1.length; j++) {
    values = split(lines1[j], "\t");
    a = values[0];
    b = values[1];
    suma = suma + a;
    sumb = sumb + b;
}
print (name);
namea= "Sum nb branches "+ suma;
nameb= "sum nb junctions "+ sumb;
print (namea);
print (nameb);

sumc = 0;
    selectWindow("Branch information");
lines1 = split(getInfo(), "\n");
headings = split(lines1[0], "\t");
for (j=1; j<lines1.length; j++) {
    values = split(lines1[j], "\t");
    c = values [1];
    sumc=sumc + c;
}
namec="Sum branch length "+sumc;
print (namec);

selectWindow("Tagged skeleton");
saveAs("Tiff", "C:/Users/pel05144/Desktop/Rings DIL-Fluoréscéine/Résultats/Tagged
skeleton/DIL/22°C 14D/Ring"+n+"/"+"name");
close();
selectWindow("Log");
saveAs("Text", "C:/Users/pel05144/Desktop/Rings DIL-Fluoréscéine/Résultats/junctions and
branches/DIL/22°C 14D/Ring"+n+"/"+"name");
close("Log");

```

```
close("Results");  
close("Branch information");  
close("canaliculi-labeled-skeletons");  
close("Résultats.tif");  
close(name+".txt");
```

```
x=x+1;  
}  
n=n+1;  
}
```

Annexes - communications

Journées Françaises de Biologie des Tissus Minéralisés (JFBTM), Boulogne-sur-mer, Juin 2019. Communication orale	196
Journée de la Recherche de l'Ecole Doctorale Sciences Ingénierie Santé, Juin 2019. Poster et communication orale – 3 ^{ème} prix du jury	198
European Calcified Tissue Society (ECTS), Digital Congress, Octobre 2020. Poster et communication orale	199
33ème congrès français de rhumatologie, Société Française de Rhumatologie (SFR), édition digitale, Décembre 2020. Communication orale	201

Journées Françaises de Biologie des Tissus Minéralisés (JFBTM), Boulogne-sur-mer, Juin 2019. Communication orale.

L'IMMOBILISATION PARTIELLE EN CONDITION DE NEUTRALITE THERMIQUE INDUIT UNE PERTE OSSEUSE SANS MODIFICATION DE L'ADIPOSITE MEDULLAIRE OU DES MARQUEURS DE SENESCENCE ET D'APOPTOSE OSTEOCYTAIRE.

Laura PEURIERE, Carmelo MASTRANDREA, Marie-Hélène LAFAGE-PROUST, Laurence VICO

Le modèle murin de suspension par la queue (SUSP) qui met en décharge les pattes arrières, induit une augmentation de la résorption ostéoclastique et une perte osseuse fémorale et tibiale. Dans ce modèle, analogue des conditions spatiales, la perte osseuse s'accompagnerait d'une augmentation des adipocytes médullaires (BMAT), comme observé dans le vol spatial BION M1 (Gerbaix *et al.*, 2017). Une apoptose ostéocytaire a été démontrée comme facteur essentiel au déclenchement de la perte osseuse induite par un déficit en estrogène, des microfractures ou la prise prolongée de glucocorticoïdes. Cependant, en ce qui concerne la perte osseuse d'immobilisation, les données sont contradictoires (Moriishi *et al.*, 2012; Plotkin *et al.*, 2015; Cabahug-Zuckerman *et al.*, 2016). De plus, de récentes études ont démontré que la SUSP induisait des modifications du métabolisme énergétique, pouvant influencer ces facteurs. C'est pourquoi, nous avons étudié l'effet de la SUSP en condition de neutralité thermique sur la perte osseuse et les événements cellulaires associés.

Méthode : Des souris mâles C57BL/J6 de 4 mois ont été acclimatées en cage individuelle à 28°C pendant 4 semaines, n=7-10/groupe. Les souris ont été pesées, appariées et réparties aléatoirement au groupe SUSP ou contrôle (CONT). La suspension dure 5 (J5) ou 14 jours (J14). L'apport alimentaire et les cages des CONT sont identiques à celles des SUSP. Des analyses μ CT *in vivo* sont effectuées à J0, J5 et J14. Le fémur a été collecté à J5 et J14 pour des analyses histomorphométriques, immunohistochimiques (IHC), RT-qPCR et quantification de BMAT après marquage osmium.

Résultats : la SUSP induit une perte osseuse trabéculaire dès J5 avec une diminution du BV/TV de 9.6% et de 23.7% à J14 vs. CONT. Les souris SUSP J14 présentent également une perte osseuse corticale au niveau de la métaphyse distale fémorale avec une diminution de 8,7% de l'épaisseur corticale (Ct.Th), de 6,7% de l'aire corticale (Ct.Ar) et une aire médullaire (Md.Ar) inchangée, suggérant une diminution de l'apposition périostée. Une augmentation significative des surfaces ostéoclastiques trabéculaires de 72.1% à J5 et 100% à J14 est observée chez SUSP vs. CONT. Les paramètres statiques et dynamiques de formation osseuse sont inchangés à J5 et J14. Aucune différence d'expression corticale n'est observée pour les gènes apoptotiques (*FOXO3*, *p27*, *GADD153*), de sénescence (*p21*, *p16*, *p53*), et pour *Sclerostin*, *RANKL*, *IL6* et *MMP13*. La quantification de BMAT ne présente aucune variation entre

SUSP et CONT à J14 et des résultats IHC préliminaires montrent un nombre très faible et comparable de lacunes vides et d'ostéocytes apoptotiques (caspase 3+) chez SUSP et CONT.

Conclusion : Nos résultats démontrent qu'une suspension de 5 ou 14 jours à neutralité thermique induit une perte osseuse accompagnée d'une résorption ostéoclastique sans augmentation des adipocytes médullaires, ni sénescence ou apoptose ostéocytaire.

Journée de la Recherche de l'Ecole Doctorale Sciences Ingénierie Santé, Juin 2019. Poster et communication orale – 3^{ème} prix du jury.

MICROGRAVITÉ ET PERTE OSSEUSE

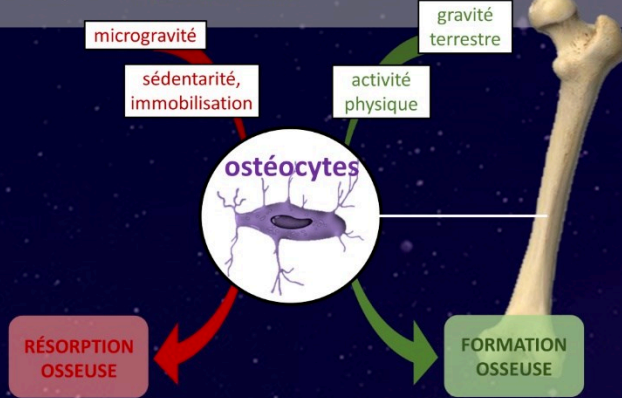
Laura PEURIÈRE, Carmelo MASTRANDREA, Marie-Hélène LAFAGE-PROUST, Laurence VICO.

Unité INSERM U1059 SAINBIOSE, Laboratoire de Biologie des Tissus Ostéoarticulaires (LBTO)



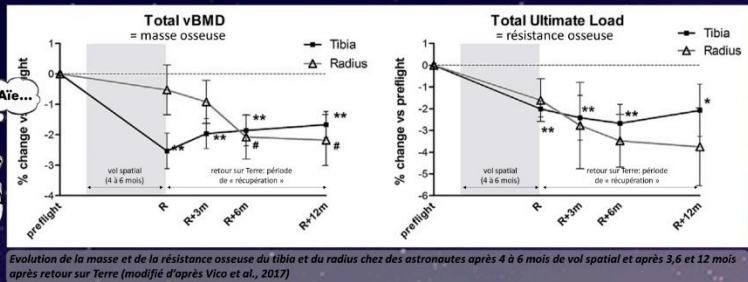
L'OS S'ADAPTE AUX CONTRAINTES MÉCANIQUES

Contrairement à l'idée reçue, l'os est un tissu en perpétuel changement. Les ostéocytes sont des cellules se trouvant dans le tissu osseux capables de ressentir les contraintes mécaniques extérieures. En présence de contraintes mécaniques (gravité terrestre, activité physique), les ostéocytes vont signaler à d'autres cellules (les ostéoblastes) de former de l'os supplémentaire pour éviter les fractures. En absence de contraintes mécaniques (microgravité, sédentarité, immobilisation), les ostéocytes ordonnent aux ostéoclastes (cellules osseuses) de résorber du tissu osseux qui est alors superflu. C'est le système du mécanostat.



ASTRONAUTES ET PERTE OSSEUSE

Dans l'espace, la gravité terrestre est presque nulle, on parle de microgravité. En absence de toute contrainte mécanique, les os des astronautes s'affaiblissent très rapidement: ils perdent en moyenne autant de masse osseuse en un seul mois qu'une femme âgée de plus de 50 ans en 2 ans sur Terre. Lorsque les astronautes retournent sur Terre, la détérioration de la masse et de la résistance osseuse peuvent continuer à diminuer et ne reviennent jamais à la normale (malgré le retour de la gravité terrestre!). Le système du mécanostat ne semble plus fonctionner.



LA MISSION SPATIALE BION M1

Afin d'étudier les mécanismes cellulaires de la perte osseuse de microgravité/d'immobilisation, 10 souris ont effectué un vol spatial d'un mois via la mission spatiale Bion M1. Les analyses ont mis en évidence qu'une partie des ostéocytes avaient disparu!

SUJET DE THÈSE RÔLE DES OSTÉOCYTES DANS LA PERTE OSSEUSE D'IMMOBILISATION: PRÉPARATION DU VOL SPATIAL BION M2

- Identifier la séquence des changements des différents événements cellulaires intervenant dans la perte osseuse de microgravité et dans l'absence de récupération (masse osseuse, architecture osseuse, activité des différentes cellules osseuses, vascularisation, adiposité)
- Identifier le rôle des ostéocytes parmi tous ces événements
- Développer une stratégie de prévention

Merci !



PORTÉES DE CES RECHERCHES

- À COURT TERME**
Amélioration de la compréhension du déconditionnement osseux lors des vols spatiaux
Préparation du vol spatial Bion M2 (2023)
- À MOYEN TERME**
Améliorer la prévention pour les astronautes
- À LONG TERME**
Amélioration de la compréhension du déconditionnement osseux pathologique sur Terre
Prévention des pathologies osseuses



European Calcified Tissue Society (ECTS), Digital Congress, Octobre 2020. Poster et communication orale.

Thermoneutral temperature mitigates hind-limb unloading-induced bone loss by preserving energetic metabolism

Hind-Limb Unloading (HLU) induces both bone loss and expansion of bone marrow adipose tissue (BMAT). However, BMAT depends on energetic metabolism, which may be challenged by HLU, since experimental conditions may alter body temperature. Therefore, we compared the effects of HLU on bone, at 22°C, the current standard experimental temperature, to those at 28°C, a thermoneutral temperature in mice.

16 week-old male C57BL/6J mice were acclimatized for 4 weeks (1 mouse/cage) and then submitted to HLU or kept, pair-fed with respective HLU mice, in control cages (CONT) for 14 days at either 22°C or 28°C (201611231457342-V6, CEEAL-UJM#98). *In vivo* μ CT was performed at Days 0 and 14. Femora were collected for histomorphometry, osmium-stained BMAT quantification and RT-qPCR mRNA analyses of cortical bone.

In HLU, body weight and food consumption were respectively lower and higher at 22°C than at 28°C. Moreover, HLU22°C showed 5.6-times lower leptin serum levels and higher BMAT volume compared to CONT22°C and both 28°C groups. Trabecular bone loss amplitude was respectively 3.7 and 1.5-times greater in CONT22°C and HLU22°C compared to the respective 28°C groups (Fig.1). Similar results were found in cortical bone. Femur trabecular osteoclastic surfaces were higher at 22°C (6.6% and 8.0% in CONT and HLU) than at 28°C (2.3% and 3.9% in CONT and HLU), respectively. Interestingly, we found higher cortical expression of apoptosis genes (DDIT3, P27) and RANKL at 22°C than at 28°C, regardless of loading condition.

We conclude that HLU effects on bone at 22°C are strongly influenced by energetic metabolic challenge.

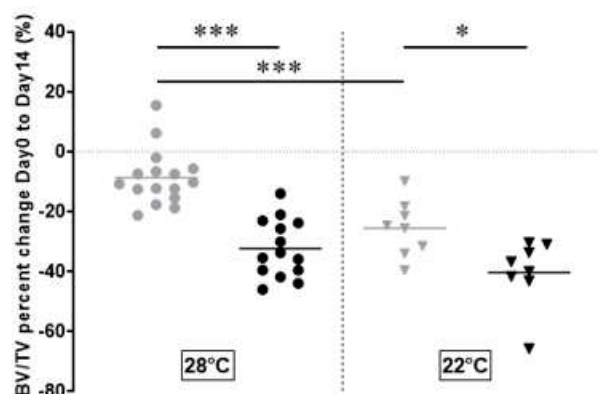


Figure 1: Femur trabecular volume percent change between Days 0 and 14 in control mice (grey) and HLU mice (black), (BV/TV, μ CT). * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, Mann-Whitney.

P206 Thermoneutral temperature mitigates hind-limb unloading-induced bone loss by preserving energetic metabolism

Laura Peurière¹, Carmelo Mastrandrea¹, Marie-Hélène Lafage-Proust¹, Laurence Vico¹
 1 INSERM U1059 – SAINBIOSE, LBTO, Université de Lyon, Saint-Etienne, France.

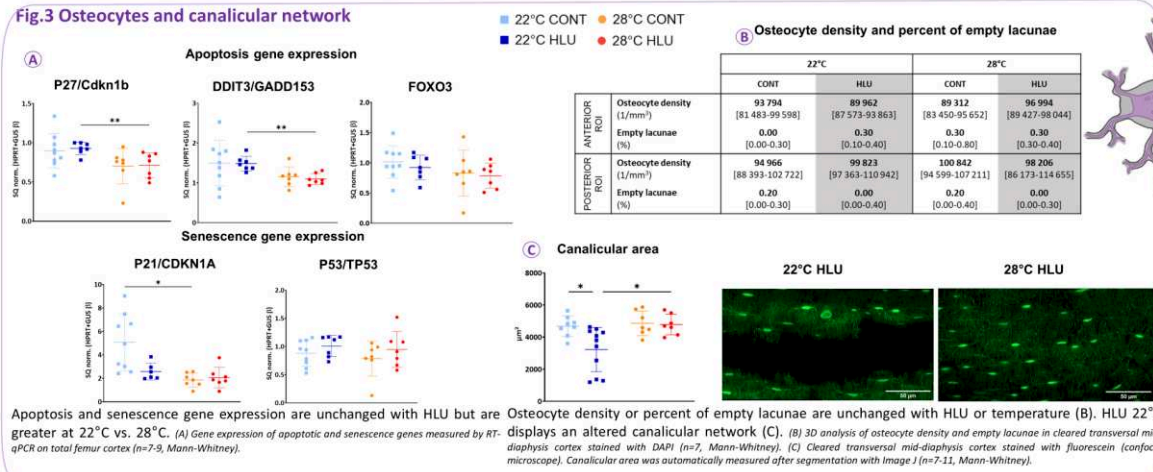
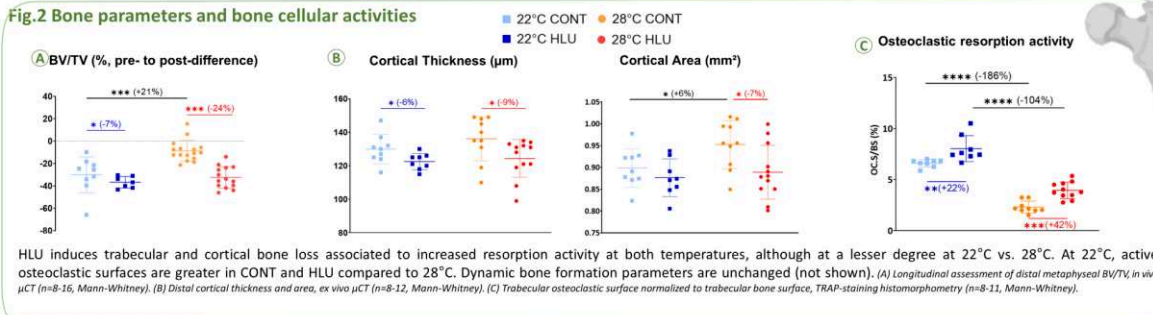
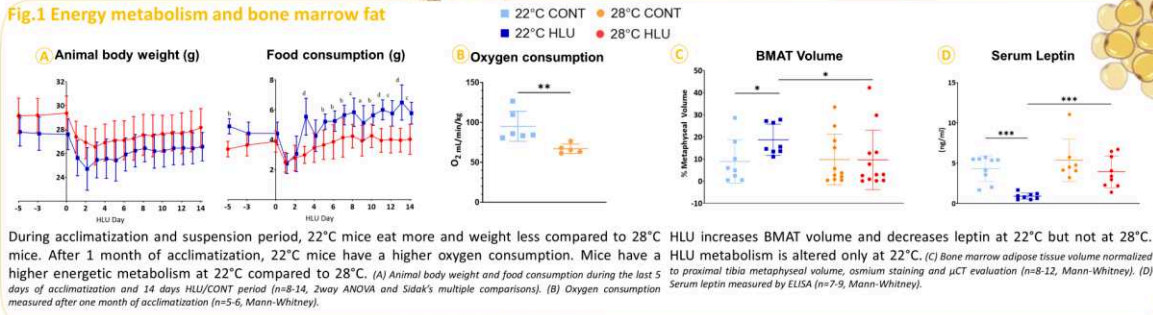


Background

Hindlimb Unloading (HLU) rodent model induces bone loss associated with increased resorption, Bone Marrow Adipose Tissue (BMAT) expansion, and osteocyte apoptosis. However, bone is also a metabolic organ, and most HLU studies were performed at 22°C (standard temperature), whereas thermoneutrality in mice was evaluated around 30°C. Considering the possible metabolic aspect of unloading bone loss, we compared HLU effect on bone at 22°C (standard temperature) and 28°C (thermoneutral temperature).

Protocol

- Hind Limb Unloading (HLU) model
- C57BL/6J mice, males, 20-week old
- Control mice (CONT) pair-fed
- Same cages for CONT and HLU mice (isolation)
- Ambient temperature: 22°C or 28°C



CONCLUSION Bone is significantly more affected by temperature than by unloading. At thermoneutrality (28°C), unloading-bone loss is associated with an increased resorption activity but not BMAT expansion or osteocyte apoptosis.



33ème congrès français de rhumatologie, Société Française de Rhumatologie (SFR), édition digitale, Décembre 2020. Communication orale.

LA NEUTRALITE THERMIQUE ATTENUÉ LA PERTE OSSEUSE D'IMMOBILISATION EN PRESERVANT LE METABOLISME ENERGETIQUE

Le modèle murin de suspension par la queue (SUSP), qui met en décharge les pattes arrières, induit une perte osseuse des membres postérieurs ainsi qu'une expansion du tissu adipeux médullaire (BMAT). Cependant, la BMAT étant dépendante du métabolisme énergétique, elle pourrait être augmentée lors de la SUSP, où les conditions expérimentales pourraient altérer la température corporelle. Nous avons donc comparé les effets osseux de la SUSP à 22°C, température expérimentale standard, à ceux à 28°C, soit dans la zone de thermoneutralité chez la souris.

Des souris mâles C57BL/6J âgées de 16 semaines ont été acclimatées pendant 4 semaines en cage individuelle puis soumises à la SUSP ou maintenues dans une cage contrôle (CONT) pendant 14 jours à une température environnante de 22°C ou 28°C. La prise alimentaire (201611231457342-V6, CEEAL-UJM#98) des souris CONT a été appariée à celle des souris SUSP. Des scans μ CT *in vivo* ont été réalisés à J0 et J14. En fin de protocole, les fémurs ont été prélevés pour des analyses histomorphométriques, une quantification de la BMAT par imprégnation osmium, et une analyse des ARNm de l'os cortical par RT-qPCR.

A 22°C, les souris SUSP présentent des taux sériques de leptine largement inférieurs ainsi qu'un volume de BMAT supérieur à leur CONT. A 28°C, aucune variation de ces paramètres n'est observée entre CONT et SUSP. La perte osseuse trabéculaire est respectivement 3.7 et 1.5 fois plus élevée chez les souris CONT 22°C et SUSP 22°C comparés aux groupes respectifs à 28°C. Des résultats similaires ont été trouvés dans l'os cortical. Les surfaces ostéoclastiques trabéculaires sont plus élevées à 22°C (Oc.S/BS, % : 6.6 chez CONT et 8.0 chez SUSP) qu'à 28°C (Oc.S/BS, % : 2.3 chez CONT et 3.9 chez SUSP). Au niveau cortical, les expressions géniques sont plus élevées pour les facteurs apoptotiques DDIT3 et P27 ainsi que pour RANKL chez SUSP 22°C comparé à SUSP 28°C. Aucune variation significative n'a été cependant observée entre les CONT et les SUSP.

Le modèle de suspension implique un isolement de la souris ainsi qu'une absence d'enrichissement de l'environnement qui empêche la fabrication d'un nid. Une température de 22°C, inférieure à la thermoneutralité, induit un stress thermique qui augmente les dépenses énergétiques, modifie le métabolisme, diminue la masse osseuse et influence la cinétique de perte osseuse chez les SUSP.

Il est donc important de tenir compte des facteurs susceptibles de modifier la thermorégulation, pour dégager les effets de l'immobilisation seule.

Abstract

Introduction The Hind-Limb Unloading (HLU) murine model is a spatial analog to study unloading-induced bone loss in astronauts. It is well documented that HLU decreases trabecular and cortical parameters in femur and tibiae. At this day, this bone loss is associated with increased resorption activity, expansion of bone marrow adipose tissue and osteocyte apoptosis. However, role of osteocyte in unloading-bone loss is still controversial and misunderstood. Moreover, HLU studies were performed with the standard housing temperature 22°C, whereas thermoneutrality in mice, that means temperature for which mice don't expend energy to maintain their body warmth, were evaluated around 30°C in several studies. Therefore, we compare the effect of HLU on bone and more specifically on osteocytes, at the standard housing temperature (22°C) and a thermoneutral housing temperature (28°C).

Methods 16-week-old males C57BL/6J mice were acclimatized in isolation for 4 weeks at 22°C or 28°C. Mice were weighed, paired, and randomly assigned to HLU or control (CONT) groups. HLU period of 5 or 14 days was performed at 22°C or 28°C, with CONT mice pair-fed and housed in identical conditions. *In vivo* and *ex vivo* μ CT were performed to evaluate femoral trabecular and cortical bone parameters, respectively. Bone cellular activities were analysed with histomorphometry and osteocyte gene expression were assessed by RT-qPCR. Different protocols of staining were performed on cleared transversal rings to analyse osteocyte density, osteocyte network and lacuna-canalicular network.

Results At thermoneutral temperature, HLU induces patterns of femoral trabecular and cortical bone loss that corroborates with previous work. However, standard housing temperature blunting bone losses and resorption activity in both CONT and HLU. HLU induces BMAT expansion at 22°C but not at 28°C, with concomitant higher energetic metabolism at 22°C. Surprisingly, osteocyte death was not observed at neither 28°C nor 22°C, but 22°C HLU mice present a drastic alteration in osteocyte and lacuna-canalicular network.

Conclusion Our data demonstrate importance of confounding effect of housing temperature in HLU model and draw into question the validity of some previously identified changes attributed to unloading given cold-stress on animals. Absence of osteocyte death and observation of altered connectivity in osteocyte and lacuna-canalicular network at thermoneutrality highlight a new possible role of osteocyte and mechanism in unloading-induced bone loss.

Key words Hind-Limb Unloading, Osteocytes, Thermoneutrality

Main bibliographical references

- Gerbaix & al., 2017. One-month spaceflight compromises the bone microstructure, tissue-level mechanical properties, osteocyte survival and lacunae volume in mature mice skeletons. *Sci Rep* 7.
- Cabahug-Zuckerman, P. & al., 2016. Osteocyte Apoptosis Caused by Hindlimb Unloading is Required to Trigger Osteocyte RANKL Production and Subsequent Resorption of Cortical and Trabecular Bone in Mice Femurs. *J Bone Miner Res* 31, 1356–1365.
- Plotkin, L.I. & al., 2015. Inhibition of Osteocyte Apoptosis Prevents the Increase in Osteocytic Receptor Activator of Nuclear Factor κ B Ligand (RANKL) but Does Not Stop Bone Resorption or the Loss of Bone Induced by Unloading. *J Biol Chem* 290, 18934–18942.

Résumé

Introduction Le modèle murin de suspension anti-orthostatique (*Hind-Limb Unloading*, HLU) est un analogue spatial pour étudier la perte osseuse induite par décharge mécanique chez les astronautes. Il est bien documenté que l'HLU diminue les paramètres trabéculaires et corticaux dans le fémur et le tibia. A ce jour, cette perte osseuse est associée à une augmentation de l'activité de résorption, une expansion du tissu adipeux médullaire (TAM) et une apoptose ostéocytaire. Cependant, le rôle des ostéocytes dans la perte osseuse d'immobilisation reste controversé. De plus, la majorité des études HLU ont été effectuées à une température ambiante standard de 22°C, alors que la thermoneutralité chez la souris, c'est-à-dire la température pour laquelle elle ne dépense pas d'énergie pour maintenir sa chaleur corporelle, a été évaluée aux environs de 30°C par plusieurs études. De ces faits, nous avons comparés l'effet de l'HLU sur l'os et plus particulièrement les ostéocytes, à une température ambiante standard (22°C) et à une température ambiante thermoneutre (28°C).

Méthodes Des souris mâles C57BL/6J de 16 semaines ont été acclimatées en condition d'isolement pendant 4 semaines à 22°C ou 28°C. Les souris ont été pesées, appariées, et assignées aléatoirement au groupe HLU ou contrôle (CONT). Une période d'HLU de 5 ou 14 jours a été effectuée à 22°C ou 28°C, avec les souris CONT appariées pour la consommation alimentaire et hébergées dans des conditions identiques aux souris HLU. Les paramètres trabéculaires et corticaux du fémur ont été évalués via des analyses μ CT *in vivo* et *ex vivo*, respectivement. Les activités cellulaires osseuses ont été analysées par histomorphométrie et l'expression des gènes ostéocytaires par RT-qPCR. Différents protocoles de marquages sur des rings fémoraux transparisés ont permis d'analyser la densité ostéocytaire, le réseau ostéocytaire et le réseau lacuno-canaliculaire.

Résultats A thermoneutralité, l'HLU induit une perte osseuse fémorale trabéculaire et corticale qui corrobore avec les études antécédentes. Cependant, une température ambiante de 22°C exacerbe cette perte osseuse ainsi que l'activité de résorption chez les souris CONT et HLU. De plus, l'HLU induit une expansion du TAM à 22°C mais pas à 28°C, ainsi qu'un métabolisme énergétique plus élevé à 22°C. Étonnamment, aucun signe de mort ostéocytaire n'a été observé à 28°C ou 22°C. Cependant, les souris 22°C HLU présentent une réelle altération de la connectivité dans le réseau ostéocytaire et le réseau lacuno-canaliculaire.

Conclusion Nos données démontrent l'importance de l'effet confondant de la température d'hébergement dans le modèle HLU, et remet en question la validité de certains résultats précédents attribués à la suspension, étant donné le stress thermique chez les animaux. L'absence de mort ostéocytaire et l'observation d'une altération dans la communication du réseau ostéocytaire et lacuno-canaliculaire met en lumière un nouveau possible rôle des ostéocytes et mécanisme dans la perte osseuse induite par une décharge mécanique.

Mots-clés Suspension, Ostéocytes, Thermoneutralité

Principales références bibliographiques

Gerbaix & al., 2017. One-month spaceflight compromises the bone microstructure, tissue-level mechanical properties, osteocyte survival and lacunae volume in mature mice skeletons. *Sci Rep* 7.

Cabahug-Zuckerman, P. & al., 2016. Osteocyte Apoptosis Caused by Hindlimb Unloading is Required to Trigger Osteocyte RANKL Production and Subsequent Resorption of Cortical and Trabecular Bone in Mice Femurs. *J Bone Miner Res* 31, 1356–1365.

Plotkin, L.I. & al., 2015. Inhibition of Osteocyte Apoptosis Prevents the Increase in Osteocytic Receptor Activator of Nuclear Factor κ B Ligand (RANKL) but Does Not Stop Bone Resorption or the Loss of Bone Induced by Unloading. *J Biol Chem* 290, 18934–18942.