



HAL
open science

Mécanismes impliqués dans le développement de l'ostéoporose au cours des surcharges en fer

François Robin

► **To cite this version:**

François Robin. Mécanismes impliqués dans le développement de l'ostéoporose au cours des surcharges en fer. Médecine humaine et pathologie. Université de Rennes, 2022. Français. NNT : 2022REN1B050 . tel-04373516

HAL Id: tel-04373516

<https://theses.hal.science/tel-04373516>

Submitted on 5 Jan 2024

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.

THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE DE RENNES 1

ÉCOLE DOCTORALE N° 605

BIOLOGIE-SANTE

Spécialité : Nutrition et Pathologies Métaboliques

Par

François ROBIN

Mécanismes impliqués dans le développement de l'ostéoporose au cours des surcharges en fer

Thèse présentée et soutenue à Rennes, le 28/10/2022

Unité de recherche : Inserm U1241, Institut NuMeCan

Rapporteurs avant soutenance :

Catherine MURA

Professeure des Universités – Université d'Orléans

Thomas FUNCK-BRENTANO

Maitre de Conférences – Praticien Hospitalier – APHP

Composition du Jury :

Président :

Erick LEGRAND

Professeur des universités – Praticien Hospitalier – CHU Angers

Examineurs :

Véronique BREUIL

Professeure des universités – Praticien Hospitalier – CHU Nice

Catherine MURA

Professeure des Universités – Université d'Orléans

Thomas FUNCK-BRENTANO

Maitre de Conférences des Universités – Praticien Hospitalier – APHP

Dir. de thèse :

Pascal GUGGENBUHL

Professeur des universités – Praticien Hospitalier – CHU Rennes

Co-dir. de thèse :

Olivier LOREAL

Directeur de recherche INSERM – Institut NuMeCan – Rennes

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier **Catherine Mura** et **Thomas Funck-Brentano** d'avoir accepté d'évaluer ce manuscrit et d'être les rapporteurs de cette thèse. Je remercie **Véronique Breuil** et **Erick Legrand** d'avoir accepté d'examiner ce travail au sein de ce jury.

Ce travail n'aurait pas pu arriver à son terme et voir le jour sans l'aide précieuse et indéfectible de **Olivier Loréal** et **Pascal Guggenbuhl** que je remercie chaleureusement. J'associe à ces remerciements, bien entendu, **Patricia Leroyer**, **Martine Ropert-Bouchet** et **Marie-Laure Island** qui ont fait preuve de la patience nécessaire pour m'aider à avancer dans ce travail.

Je tiens, par ailleurs, à remercier **Béatrice Bouvard**, **Frederic Derbré** et **Eric Lespessailles**, membres du comité de suivi de ce travail.

Bien entendu, comment ne pas remercier Doria, qui m'a soutenu durant toute cette période, pas toujours simple. Tu as toujours été présente à mes côtés et j'espère que ce sera le cas pour bien longtemps. Et bien sûr, merci à Chloé d'avoir rapidement fait ces nuits ! Quel bonheur de vous avoir toutes les deux.

Merci Maman et Papa de m'avoir aussi soutenu durant ce projet, comme depuis toujours, des salles de sport de Lorient à cet amphithéâtre. Merci Agnès et Nicolas, je suis vraiment content de partager ça avec vous aujourd'hui. Une grande pensée aussi pour Florence, Clément, Octave, Héloïse, Lou, Dimitri et Oona. Quelle belle famille !

Aux amis de toujours, Manon, Guillaume, Sandrine, Manu, Paul, Oriane, Arthur, Selim, merci d'avoir été là depuis toutes ces années.

Aux rennais, Etienne, Bastien, Audrey, Anaïs qui ont fait le long voyage de Brest au moment de l'internat avec moi et avec qui j'avance toujours et encore avec le même plaisir. Je n'oublie pas non plus les amis brestois, Elouan, Laurent, Maxime, Benjamin, Thomas, Julien, Servane avec qui je passe toujours des supers moments et qui sont toujours là pour moi.

Aux rhumatologues rennais, je remercie Mme Perdriger. Guillaume et Jean-David bien sûr qui m'ont tant appris. A Simon, merci pour ces boîtes à moustaches et pour ce super clinicat. A Olivia, Marine, Géraldine et Aurore avec qui j'ai partagé de supers moments, y compris dans les périodes difficiles. A Juliette, Anaïs, Caroline, Marion, Rachel, Yoann, Marie, Pierre, Solène, Clémence, Théau, Alexia avec qui j'ai eu le plaisir de travailler.

SOMMAIRE

| | |
|--|-------|
| Introduction | p. 4 |
| I) Métabolisme osseux : Physiologie et pathologie | p. 5 |
| 1) Métabolisme osseux | p. 5 |
| a. <i>Organisation générale du squelette</i> | p. 5 |
| b. <i>Organisation générale du tissu osseux</i> | p. 6 |
| I. La matrice extracellulaire | p. 6 |
| II. Les cellules osseuses | p. 8 |
| c. <i>Remodelage osseux, notion de Basic Multicellular Unit (BMU)</i> | p. 13 |
| d. <i>Rôle des métaux dans l'homéostasie osseuse</i> | p. 16 |
| 2) L'ostéoporose | p. 17 |
| a. <i>Prévalence et présentation générale</i> | p. 17 |
| b. <i>Thérapeutiques utilisées dans l'ostéoporose</i> | p. 18 |
| II) Métabolisme du fer : Physiologie et pathologie | p. 19 |
| 1) Le fer | p. 19 |
| a. <i>Métabolisme et répartition systémique du fer</i> | p. 19 |
| b. <i>Régulation systémique du métabolisme du fer</i> | p. 22 |
| 2) Fer et pathologies | p. 24 |
| a. <i>Les surcharges en fer</i> | p. 24 |
| I. D'origine génétique | p. 24 |
| II. D'origine secondaire | p. 25 |
| b. <i>Les carences en fer, absolues ou relatives</i> | p. 26 |
| 3) Le fer et les autres métaux | p. 27 |
| III) Ostéoporose des surcharges en fer | p. 29 |
| 1) Interaction entre le métabolisme du fer et le métabolisme osseux | p. 29 |
| a. <i>Fer et ostéoblastes</i> | p. 29 |
| b. <i>Fer et ostéoclastes</i> | p. 30 |
| c. <i>Fer et matrice osseuse</i> | p. 30 |
| 2) Os et hepcidine | p. 30 |
| 3) Thérapeutiques envisagées | p. 31 |
| Cadre et but du travail | p. 32 |
| Résultats | p. 35 |
| Article 1 | p. 36 |
| Article 2 | p. 70 |
| Discussion générale et perspectives | p. 79 |
| I) L'impact du fer lui-même est-il lié à sa localisation plus qu'à sa concentration ? | p. 79 |
| II) L'hepcidino-déficience est-elle l'acteur principal de la perte osseuse liée aux surcharges en fer ? | p. 82 |
| III) Le rôle des autres métaux dans l'ostéoporose | p. 84 |
| 1) Au cours des surcharges en fer | p. 84 |

| | |
|--|-------|
| 2) Dans l'ostéoporose fracturaire et densitométrique | p. 84 |
| Conclusions et perspectives | p. 86 |
| Bibliographie | p. 87 |

Mécanismes impliqués dans le développement de l'ostéoporose au cours des surcharges en fer

INTRODUCTION

L'ostéoporose est un problème de santé publique, maintenant bien connu. D'après un état des lieux récent, le coût direct des fractures incidentes en France en 2019 était de 5,05 milliards d'euros(1). Pourtant, probablement en partie en raison (ou bien du fait) de son caractère asymptomatique avant la survenue de sa complication principale qu'est la fracture, elle est insuffisamment recherchée et traitée(2,3).

En dehors de la ménopause, qui reste la situation diagnostique la plus fréquente, un grand nombre de maladies sont associées au développement d'une ostéoporose, dont la surcharge en fer, qu'elle soit génétique(4) ou secondaire(5). Les mécanismes sous-jacents pouvant expliquer cette perte osseuse associée à la surcharge en fer restent incomplètement élucidés. Plusieurs pistes de réflexion peuvent être évoquées, comme la toxicité directe du fer sur le tissu osseux, l'impact des protéines agissant dans son métabolisme, ou les interactions potentielles avec d'autres métaux. Pour renforcer cet intérêt, dans le cadre de l'ostéoporose post-ménopausique, il semblerait qu'il existe une relation positive entre la gravité de la perte osseuse et le niveau de la ferritine sérique, y compris en restant dans des valeurs normales(6).

Ainsi, ce travail a recherché à préciser les mécanismes sous tendant le développement de la perte osseuse au cours des surcharges en fer.

I) Métabolisme osseux : Physiologie et pathologie

1) Métabolisme osseux

a. Organisation générale du squelette

Le squelette humain est composé de 206 os, 126 dans le squelette appendiculaire, 74 dans le squelette axial et 6 osselets au niveau de l'oreille interne. Les rôles de l'os sont multiples : protection des organes vitaux, locomotion, homéostasie phosphocalcique, interactions avec l'environnement(7) et protection de la moelle osseuse et de l'hématopoïèse(8).

Ces os sont formés selon deux modalités d'ossification. La première concernant principalement les os plats et de la face est appelée ossification membraneuse. Elle correspond à une métaplasie directe du tissu conjonctif en tissu osseux. La seconde se déroule au niveau des os longs et est appelée ossification enchondrale. Elle fait passer l'ossification par une étape cartilagineuse intermédiaire suivie d'un processus de minéralisation secondaire(9).

Macroscopiquement, il existe deux types de structure osseuse : l'os cortical ou compact (80% de la masse osseuse) et l'os trabéculaire ou spongieux (20%) (**Figure 1**).

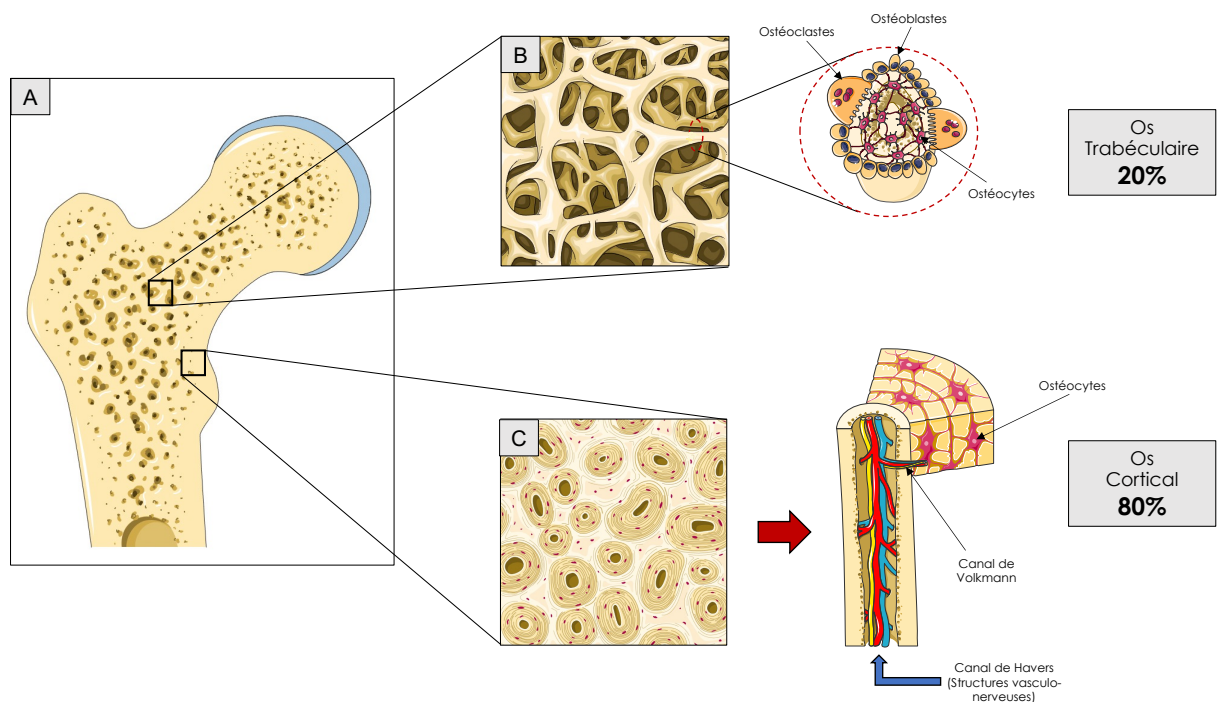


Figure 1 : Répartition schématique et organisation des types osseux. Vue de la région osseuse du col fémoral représentée à gauche (A), puis, au centre, au niveau

macroscopique avec différenciation entre os trabéculaire (B) et os cortical (C). Enfin à droite, organisation microscopique avec la coupe d'une travée osseuse en haut et les différents constituants du système de Havers en bas.

L'os cortical, ou os compact, est comme son nom l'indique, très peu poreux (porosité évaluée à environ 5-10%)(10). Il est composé d'ostéons, qui constituent le système de Havers, structures arrondies en coupe de 100 à 300 micromètres de diamètre formées de lamelles osseuses concentriques centrées par un canal (le canal de Havers, de 11 à 68 micromètres de diamètre)(11). Ces canaux, reliés à ceux de Volkmann (canaux transversaux), permettent la communication entre les ostéons, et l'apport des nutriments. Il y aurait dans la totalité de l'os cortical d'un individu sain environ 21×10^6 ostéons(12). L'os cortical est recouvert au niveau de sa surface externe par le périoste et de sa surface interne par l'endoste(13).

L'os trabéculaire est, de son côté, très poreux (porosité évaluée de 75-95%) et composé de plaques et de trabécules ou travées osseuses, d'une épaisseur globalement stable (de 150 à 300 micromètres) et d'orientation s'adaptant aux contraintes anatomiques et mécaniques de la région du squelette(10). Il représente seulement 20% de la masse osseuse complète, contient la moelle hématopoïétique. Cette organisation en travées et plaques constitue une grande surface d'échange et fait représenter 80% du remodelage osseux(13) (**Figure 1**).

b. Organisation générale du tissu osseux

I. La matrice extracellulaire

Le tissu osseux est constitué d'une matrice extracellulaire dense composée de deux parties distinctes :

- **la matrice organique** représentant environ 30% de la masse osseuse, dont 90% est représenté par les protéines collagéniques(14), principalement le collagène I (mais aussi du collagène III ou de type V, à l'état de traces). Le collagène I est une molécule à triple hélice contenant deux chaînes $\alpha 1-1$ identiques et une chaîne $\alpha 1-2$ structurellement similaire, mais provenant de deux gènes différents : respectivement COL1A1 et COL1A2(15). Le reste de la matrice osseuse (10 à 15%) est représenté par les protéines non collagéniques, comprenant des protéines issues du sérum, mais aussi les protéoglycanes, les glycoprotéines, les SIBLINGs (Small Integrin-Binding

Ligands, N-Glycosylated proteins) et les protéines contenant de l'acide γ -carboxyglutamique. Le rôle de ces protéines non collagéniques est majeur : organisation de la matrice, coordination des interactions entre les cellules osseuses, régulation du processus de minéralisation(15). Environ un quart de ces protéines non collagéniques est représenté par des protéines provenant du sérum (albumine, α 2-HS-glycoprotéines) qui peuvent se fixer dans l'os grâce à leur affinité avec l'hydroxyapatite. Les protéoglycanes sont aussi fortement représentées et impliquées dans la formation osseuse, notamment la versicane et la hyaluronane(15). Parmi les autres nombreuses protéoglycanes, l'aggrécane (connue pour son rôle au niveau du cartilage articulaire et dans résistance mécanique) et la décorine (produite en partie par l'ostéoblaste) ont un rôle primordial dans l'organisation de la matrice et des fibres de collagènes. Parmi les glycoprotéines, la phosphatase alcaline a un rôle prépondérant dans la protection de la minéralisation osseuse. Les SIBLINGs regroupent notamment l'ostéopontine, la Bone Sialo-Protéine (BSP), la fibronectine, la vitronectine, la thrombospondine et ont rôle principalement dans la régulation du processus de minéralisation osseuse et dans la fixation cellulaire(15). Le dernier type de protéines non collagéniques est représenté par les protéines contenant de l'acide γ -carboxyglutamique. Parmi ces protéines, l'ostéocalcine est la plus abondante (15-25%). Elle agit comme une hormone, assurant principalement la bonne qualité osseuse, en régulant l'activité des ostéoclastes et en coordonnant le processus de remodelage osseux, notamment lors de la phase d'inversion(16). Les principales protéines non collagéniques et leur rôle sur le processus de minéralisation ont été résumées dans le **Tableau 1**.

| Augmentation de la minéralisation | Diminution de la minéralisation | Activité mixte |
|---|---|---|
| BSP, BAG-75, Phosphatase alcaline, Phospho-1, Ostéoadhérine, Protéolipides | Aggrécane α 2-HS-glycoprotéine, Ostéocalcine, Matrix Gla-Protéine | Biglycane Ostéonectine Fibronectine Ostéopontine |

Tableau 1 : Principales protéines non collagéniques et leur rôle sur le processus de minéralisation osseuse.

Cette matrice organique est souvent présentée comme ayant un rôle biomécanique primordial en formant l'« échafaudage » du tissu osseux et en protégeant les cellules(17). Pour autant, elle a aussi un rôle majeur dans la communication intercellulaire par l'adhésion ou la fixation à sa surface de facteurs de croissance, dans la différenciation cellulaire, dans la protection de l'homéostasie hématopoïétique et osseuse(17).

- **la matrice inorganique ou phase minérale** formée de cristaux d'hydroxyapatite ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), représente environ 60% de la masse osseuse. Ces cristaux possèdent une surface fortement ionisée et liée à l'eau de la matrice extracellulaire permettant des échanges ioniques multiples(12). Cette caractéristique permet une mobilisation rapide des réserves de phosphate et de calcium contenues dans l'os et a un rôle prépondérant dans l'équilibre phosphocalcique de l'os et de l'organisme. De plus, ces échanges ioniques expliquent qu'au sein du tissu osseux, une grande quantité de l'apatite osseuse soit modifiée par rapport à sa structure moléculaire de base, modifiant ses propriétés physico-chimiques. Les principales substitutions se font avec le carbonate, le magnésium, le phosphate, mais aussi avec un grand nombre d'éléments traces, ce qui explique que la structure des cristaux dépend en partie de l'alimentation et de l'environnement(15).

- Le reste de la matrice osseuse (10%) est principalement formé d'eau, permettant les échanges par l'intermédiaire du système canaliculaire.

II. Les cellules osseuses

Dans le squelette adulte, il est décrit 3 grands types cellulaires ayant des actions et des rôles différents :

- **les ostéoblastes** représentent 4 à 6% des cellules osseuses ; ils dérivent des cellules souches mésenchymateuses. A partir de cette cellule initiale multipotente, l'orientation dans la lignée ostéoblastique est liée à plusieurs étapes. La première permet la création d'un précurseur ostéochondral sous la dépendance de la voie Wingless-related integration site (Wnt) et des Bone Morphogenic Proteins (BMPs)(18). La voie Wnt/ β -caténine est un acteur majeur de la formation osseuse. Les protéines Wnt se fixent sur un récepteur transmembranaire (frizzled) couplé à un corécepteur situé sur la membrane ostéoblastique (LRP5/6) ce qui entraîne une cascade intracellulaire stabilisant la β -caténine. Cette dernière va pouvoir se lier à des facteurs

de transcription au niveau du noyau et favoriser la formation osseuse. Cette voie est naturellement inhibée par certains facteurs tels que le facteur soluble Dickkopf1 (DKK1) qui interagit avec le récepteur transmembranaire Kremen 1 et qui provoque l'endocytose de LRP5/6(19) ou la sclérostine, qui elle se fixe directement sur LRP5/6(20,21). La différenciation des pré-ostéoblastes en ostéoblastes se fait alors principalement par l'intermédiaire du Runt-related transcription factor 2 (Runx2)(22), mais aussi via Ostérix (Osx) et drosophila distal-less 5 (DLX5)(18). Osx/Sp7 est un facteur de transcription doigts de zinc, ayant un rôle fondamental dans la différenciation en ostéoblastes fonctionnels(23). DLX5, va lui activer Runx2, et être ainsi un acteur important dans la différenciation ostéoblastique(24). C'est à ce stade que la cellule ostéoblastique commence à exprimer des gènes spécifiques de la lignée osseuse, tels que la phosphatase alcaline osseuse (ALP) et le collagène 1 (COL1A1)(18). D'autres marqueurs sont d'apparition plus tardive dans la maturation cellulaire, comme l'ostéopontine ou l'ostéocalcine (**Figure 2**). Le facteur Runx2 permet une régulation de la formation osseuse en devenant inhibiteur de l'activité de l'ostéoblaste mature(25).

L'ostéoblaste mature est une cellule cubique mononuclée, ayant pour rôle la formation du tissu osseux. Cette cellule agit toujours associée à d'autres ostéoblastes grâce à un système sophistiqué de communication intercellulaire par l'intermédiaire de GAP-jonctions permettant la synchronisation des cellules et le couplage électrochimique(26). Le devenir de ces cellules est multiple : une partie meurt par apoptose, une deuxième partie reste à la surface de l'os sous forme de cellules bordantes, pouvant se réactiver et formant la canopée limitant le compartiment où a lieu le remodelage osseux, et une troisième partie arrête son activité pour « s'emmurer » dans une logette, appelée ostéoplaste, et devenir un ostéocyte (**Figure 2**).

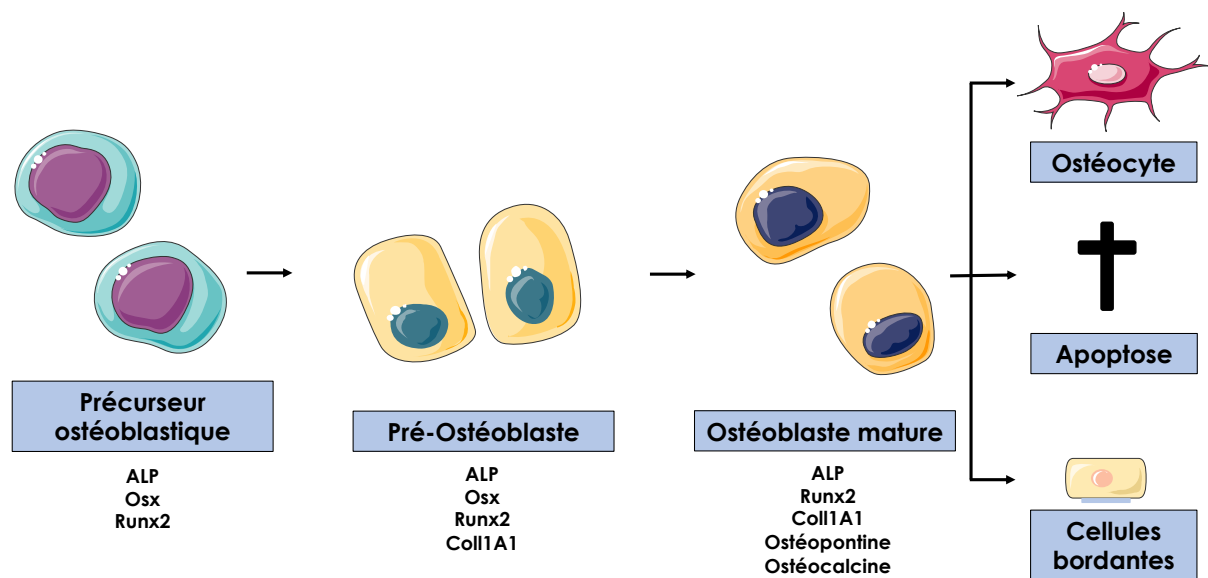


Figure 2 : Représentation schématique des étapes de différenciation en ostéoblaste à partir du précurseur ostéoblastique, avec les gènes exprimés en fonction des étapes. Orientation de l'ostéoblaste mature vers 3 stades d'évolution (cellules bordantes quiescentes, apoptose et ostéocytes).

- **les ostéocytes** représentent 90% des cellules osseuses. Ce sont des ostéoblastes ayant cessé leur activité et intégrés dans un ostéoplaste (15 à 20 μm)(27). Cette cellule maintient ses communications (GAP-jonctions) avec les autres ostéocytes, les ostéoblastes et les cellules bordantes par un système lacuno-canaliculaire très développé et très étendu(26). Ce système lacuno-canaliculaire permet un dialogue intercellulaire indispensable à l'homéostasie du tissu osseux. Cette cellule possède un rôle prépondérant, notamment de sentinelle permettant la surveillance du maintien d'une bonne qualité osseuse, et de renseigner, en permanence, les autres cellules sur la viabilité du tissu osseux. C'est le véritable chef d'orchestre du remodelage osseux. Elle possède notamment un rôle de mécano-récepteur par l'intermédiaire des mouvements liquidiens à l'intérieur du système lacuno-canaliculaire capté par le cil primaire lors des micromouvements osseux liés aux contraintes mécaniques, entraînant la stimulation par l'ostéocyte du mécanisme de remodelage osseux(28). C'est aussi un mécano-transducteur qui va transformer un signal mécanique en signal biologique. La survenue de microfissures, phénomène physiologique au cours de la vie du squelette, entraîne une discontinuité dans le système de connexion lacuno-canaliculaire, responsable de la sécrétion de Receptor

Activator of Nuclear Factor- κ B Ligand (RANKL) par l'ostéocyte. Celui-ci recrute les précurseurs ostéoclastiques et ainsi stimule le remodelage osseux(29).

En plus de son action de mécano-transducteur, l'ostéocyte a aussi un rôle important de sécrétion RANKL qui, par effet paracrine, peut stimuler la résorption osseuse (première étape du remodelage osseux au sein de la Basic Multicellular Unit (BMU)), en stimulant la différenciation des précurseurs hématopoïétiques en ostéoclastes(26). Outre le RANKL, la production d'ostéoprotégérine (OPG) et de sclérostine par l'ostéocyte a aussi un rôle dans le maintien de la qualité osseuse en modulant la résorption et la formation osseuse (26,30). Au niveau systémique, les ostéocytes produisent une hormone, le Fibroblast Growth Factor 23 (FGF23) qui a un rôle majeur dans l'homéostasie phosphocalcique. Cette hormone est produite principalement au niveau de l'os(31). Le FGF23, en association à son corécepteur α -Klotho, a comme rôle physiologique de réguler la phosphatémie en diminuant l'absorption digestive de phosphate et au niveau rénal en limitant la réabsorption du phosphate au niveau du tubule proximal, en inhibant l'activité de la 1- α -hydroxylase, diminuant ainsi la quantité de 1-25OH Vitamine D(32,33). Le FGF23 diminue également la production de parathormone (PTH)(31). Une mutation activatrice du gène du FGF23 est impliquée dans plusieurs pathologies responsables d'une hypophosphatémie liée à une fuite phosphatée et responsable d'une ostéomalacie (hypophosphatémie liée à l'X ou ostéomalacie induite par une tumeur sécrétant du FGF23 par exemple)(34).

Plus récemment, un lien entre FGF23 et le métabolisme du fer a été mis en évidence(31). Trois conditions principales ont été décrites :i) la carence martiale, responsable d'une augmentation de la sécrétion de FGF23, ii) l'inflammation(35), entraînant une hyper-hepcidinémie responsable d'une séquestration du fer au niveau macrophagique (voir partie II.1)b.), et donc une carence martiale fonctionnelle, là aussi, responsable d'une augmentation de la sécrétion de FGF23(31), iii) enfin, l'utilisation de perfusions de fer pour traiter une carence martiale peut entraîner une augmentation du FGF23, responsable d'hypophosphatémie potentiellement profonde et symptomatique (incidence de l'hypophosphatémie de 8% après fer deriso-maltose et de 74% après fer carboxy-maltose)(36). L'utilisation chronique de ces traitements peut même aboutir au développement de maladies musculaires (myopathies), de troubles de minéralisation osseuse (ostéomalacie) ou de fractures(36).

- **les ostéoclastes** représentent 4 à 6% des cellules osseuses et dérivent de précurseurs hématopoïétiques. La différenciation en ostéoclastes à partir du précurseur monocytaire est principalement modulée par le RANKL (produit, entre autre, par les ostéoblastes et ostéocytes(37)) et l'axe RANK-RANKL-OPG. L'ostéoclaste est une cellule géante polynucléée, spécialisée dans la résorption osseuse. Cette résorption se fait par l'intermédiaire de la création d'une chambre de résorption après adhérence entre l'ostéopontine et l'intégrine $\alpha\beta3$ (38). Cette chambre de résorption se situe sous la membrane ondulée de l'ostéoclaste. Lors du processus physiologique de remodelage osseux, elle permet la déminéralisation osseuse par l'intermédiaire d'une pompe à protons, puis la résorption de la matrice osseuse déminéralisée par, entre autre, l'action de la cathepsine K, des métalloprotéinases (MMP), notamment MMP-9, ou de la phosphatase acide résistante au tartrate (TRAcP)(37). Les intégrines responsables de l'adhérence cellulaire sont couplées à l'actine intracellulaire organisée en anneau, qui se contracte sous l'effet de l'augmentation de la concentration intracellulaire de calcium lors de la résorption osseuse, entraînant la perte d'adhérence de la chambre de résorption. Ce fonctionnement permet une homogénéité de la profondeur de résorption, de l'ordre de 40 μm (37,39), la résorption se faisant de proche en proche (**Figure 3**).

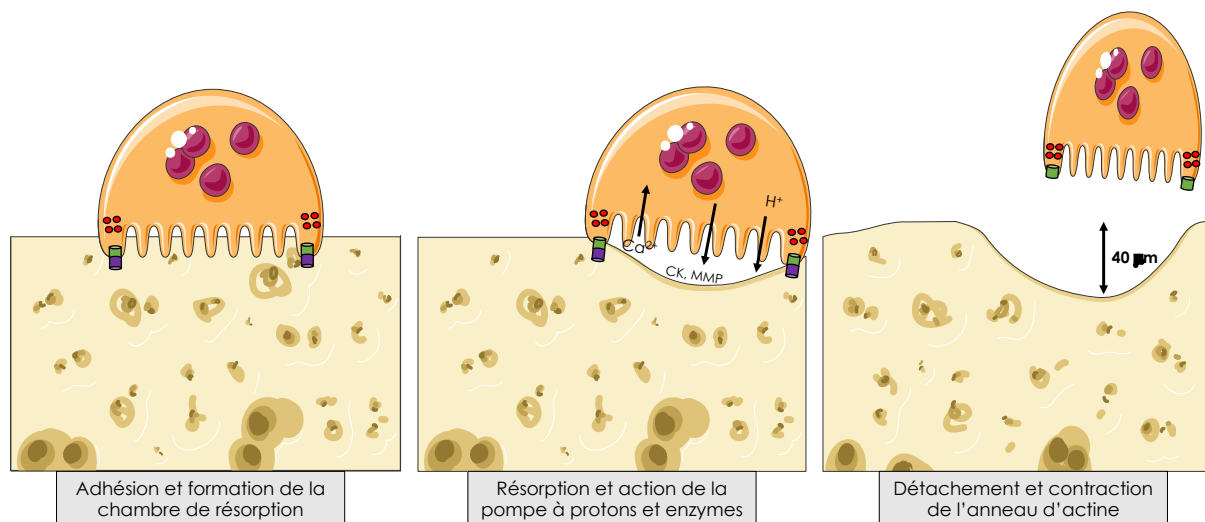


Figure 3 : Modalités de la résorption osseuse. Première étape d'adhérence à gauche entre l'intégrine $\alpha\beta3$ des ostéoclastes (cylindre vert) et l'ostéopontine (cylindre violet) formant la chambre de résorption. Au centre de la figure, deuxième étape au centre de déminéralisation et résorption par la sécrétion de protons et par le relargage de métalloprotéinases (MMP) et cathepsine K (CK). Augmentation progressive du

calcium intracellulaire liée à la résorption osseuse, entraînant la troisième étape à droite et le détachement de l'ostéoclaste par contraction de l'anneau intracellulaire d'actine (ronds rouges).

c. Remodelage osseux, notion de Basic Multicellular Unit (BMU)

La notion de BMU est centrale pour la compréhension du remodelage osseux. Celui-ci fonctionne grâce à un couplage coordonné entre formation et résorption osseuse (40,41). Ce couplage est étroitement lié à la connexion entre les 3 types cellulaires présents dans le tissu osseux, et notamment entre l'action des ostéoclastes et des ostéoblastes(42). Cette connexion a ainsi vu le développement de la notion d'une BMU, unité de base du remodelage osseux, permettant la formation d'un os minéralisé de bonne qualité(43).

Le principe de base de cette BMU est globalement bien identifié (**Figure 4**). La mise en évidence d'une diminution qualitative ou quantitative du tissu osseux par les ostéocytes entraîne la sécrétion par les ostéocytes et les cellules bordantes d'une grande quantité de molécules permettant le recrutement, la survie et la différenciation d'un précurseur monocyttaire en ostéoclaste mature lançant le processus de résorption osseuse (notamment le RANKL, le Colony-stimulating factor-1 (csf-1) ou la Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1))(44–46). De plus, l'ostéocyte à l'état basal sécrète du TGF- β , inhibant l'ostéoclastogénèse. L'apoptose locale des ostéocytes en cas d'altération osseuse entraîne une diminution de la production de TGF- β , responsable d'une augmentation de la différenciation des cellules monocytaires en ostéoclastes(44). Ces différentes étapes constituent les phases d'activation et de résorption du remodelage osseux(47). Le processus de résorption est ensuite classique, tel que décrit dans la partie (I.1)b.II., **Figure 3**).

Pendant plusieurs années, il était évoqué que le nécessaire couplage entre l'activité ostéoclastique de résorption et l'activité ostéoblastique de formation était lié à la libération lors de la résorption osseuse de cytokines emprisonnées dans la matrice osseuse. Les molécules identifiées, notamment IGF 1(48), BMPs(49,50), TGF- β (51), Platelet Derived Growth Factor(PDGF)(52) permettraient ainsi l'activation, la survie et la différenciation des cellules ostéoblastiques. L'étude de modèles expérimentaux avec résorption osseuse défailante mais avec formation osseuse toujours

efficace(47,53) a fait naître de nouvelles hypothèses sur ce mécanisme de couplage, mettant en avant le rôle prépondérant de la communication ostéoclastes-ostéoblastes. Un grand nombre de molécules directement sécrétées par l'ostéoclaste. Wnt10b(54), Cardiotrophine-1 (CT-1)(55), Sphingosine-1-Phosphate (S1P)(56), collagen triple helix repeat containing-1 (CTHRC1)(57,58), C3a(59), Dipeptidyl Peptidase-4 (DPP-4)(60)) ont ainsi été décrites comme agissant dans le couplage inter-cellulaire, permettant le bon équilibre entre résorption et formation osseuse. Cette liste de facteurs n'est pas exhaustive et s'allonge au fil des années(60). Enfin, les interactions cellulaires directes entre l'ephrinB2 sur la membrane des ostéoclastes et l'ephrinB4 sur la membrane des ostéoblastes inhibent l'ostéoclastogénèse et stimulent l'ostéoblastogénèse, jouant un rôle amplificateur dans la phase de transition entre l'étape de résorption et de formation osseuse(61).

Après une étape d'inversion marquée par la fin de la phase de résorption et la préparation de la surface osseuse pour la suite du travail de remodelage, la différenciation et l'activation des ostéoblastes matures permettent le passage à l'étape de formation osseuse. Ces processus aboutissent à la formation d'un tissu osseux en deux étapes. En premier lieu, il y a formation d'un tissu ostéoïde (non minéralisé) composé de protéines collagéniques et non collagéniques(44,62). Puis, à l'intérieur de cet échafaudage protéique vont se déposer des cristaux d'hydroxyapatite pour former un os minéralisé et solide. Les mécanismes expliquant cette étape de minéralisation extracellulaire ne sont pas tous élucidés, mais la formation du cristal se fait initialement par une étape de nucléation, menée par la Bone Sialoprotein (BSP)(63), puis d'entretien du processus de minéralisation afin d'obtenir la quantité optimale de cristal pour un os de bonne qualité(44,64). Une fois cette étape terminée, la formation osseuse est finalisée.

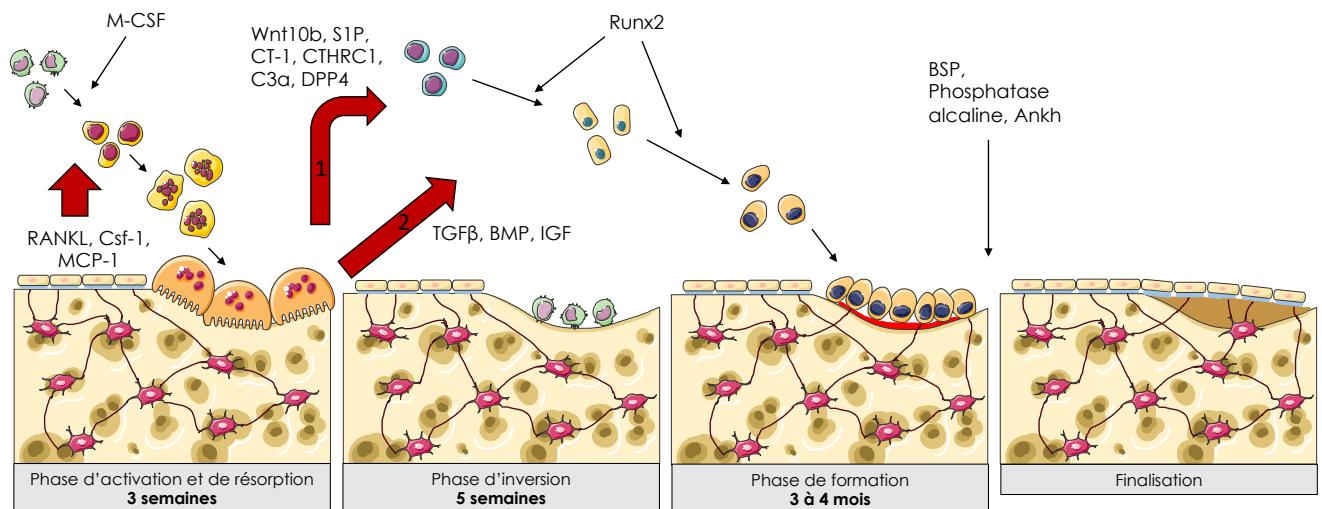


Figure 4 : Notion de BMU : Le remodelage osseux commence par une première étape de résorption osseuse après stimulation de la survie, de l'activation et de la différenciation des ostéoclastes par les cellules bordantes et les ostéocytes. Cette résorption libère des cytokines stimulant la formation osseuse (flèche 2) mais les interactions entre ostéoclastes et ostéoblastes (flèche 1) vont aussi avoir un rôle dans la mise en place de la phase de formation osseuse. Cette formation commence par le dépôt d'un os non minéralisé en rouge, ou tissu ostéoïde qui va se minéraliser par la suite l'action de BSP, Ankh et de la phosphatase alcaline. Toutes ces étapes aboutissent à la formation d'un os minéralisé définitif.

Ce processus de minéralisation reste finement régulé au niveau systémique. Le développement d'une minéralisation reste envisageable dans tous les tissus riches en calcium et en phosphate. Pour autant, dans la majorité des tissus de l'organisme, ce processus de minéralisation est inhibé par la présence de pyrophosphate inorganique (PPi), qui limite ainsi l'apparition de foyers de minéralisation ectopique. Au niveau du squelette, le processus de minéralisation se fait par un phénomène de levée d'inhibition, notamment par l'intermédiaire de l'expression spécifique d'enzymes comme la phosphatase alcaline non tissu dépendant(65), faisant partie de la grande classe des phosphatases alcalines (avec 3 isoenzymes : placentaire, non tissu dépendant et intestinale)(66). Par ailleurs, le transporteur membranaire Ankh ou l'enzyme ENPP1 (ectonucleotide pyrophosphatase 1) agissent eux aussi dans la régulation de la quantité de PPi(67). En plus, de l'inhibition systémique du PPi, des protéines, notamment des protéines non collagéniques de la matrice osseuse, telle

que l'ostéopontine ou MEPE, peuvent exercer des actions inhibitrices sur la minéralisation, localement, par exemple pour permettre la sauvegarde de zones d'interaction entre la matrice osseuse et les cellules ou la pérennité du système lacuno-canaliculaire(65).

d. Rôle des métaux dans l'homéostasie osseuse

Comme déjà évoqué, la structure minérale de l'hydroxyapatite et de l'os peut varier en fonction de l'environnement et de l'alimentation, en intégrant des métaux et des éléments traces. Ils tiennent donc un rôle important dans le métabolisme et l'homéostasie osseuse et phosphocalcique. Le premier métal qui tient une place prépondérante dans la structure osseuse est bien sûr le calcium, dont 99% de la quantité présente dans l'organisme se trouve dans l'os et qui représente 2% du poids du corps(68). Dans l'os, il assure la bonne résistance osseuse et constitue une réserve calcique mobilisable pour les échanges intra et intercellulaires(69). La répartition tissulaire et la mobilisation des réserves de calcium est un processus finement contrôlé(68). Cette régulation est fortement associée à celle du métabolisme du phosphate (quantité de 600g dans l'os environ), par l'intermédiaire de l'action de la 1-25OH Vitamine D3 (calcitriol) et de la parathormone (PTH), produite par les glandes parathyroïdes(70). La 1-25OH Vitamine D3 fonctionnelle provient initialement de l'interaction entre les ultraviolets B et le 7-déhydrocholestérol (présent au niveau de la peau), à l'origine de la vitamine D3, qui va ensuite connaître une première hydroxylation au niveau du foie aboutissant à la formation de la 25OH Vitamine D3, puis une seconde au niveau du rein donnant la forme active et fonctionnelle (1-25OH Vitamine D3) : le calcitriol(71).

Ces différents acteurs agissent en association afin de maintenir un taux de calcium sanguin stable et physiologique. La 1-25OH vitamine D3 induit une augmentation de la concentration sanguine de calcium en augmentant l'absorption digestive de calcium et la réabsorption tubulaire de calcium au niveau rénal(71). La 1-25OH vitamine D3 peut diminuer l'expression de PTH(72). Cette expression peut aussi être diminuée par la fixation du calcium au récepteur sensible au calcium. La PTH (1-84) a le rôle biologique d'augmenter le calcium extracellulaire en augmentant la réabsorption tubulaire rénale et la libération osseuse de calcium (par activité de

résorption). La PTH augmente la synthèse de 1-25OH Vitamine D3. Par ailleurs, elle a plutôt un rôle hypophosphatémiant et hyperphosphaturiant(72). Le FGF23, par son action de diminution de l'absorption digestive et de la réabsorption rénale du phosphate, de diminution de la PTH et de la 1-25OH Vitamine D3, a aussi un rôle important dans cette régulation(31).

Les autres métaux et leurs effets sur le métabolisme osseux ont souvent été décrits dans deux situations : la surcharge et la carence de chacun d'entre eux. Par exemple, les excès de cuivre(73), de plomb(74), de cadmium(75), d'aluminium(76) ont été décrits comme entraînant, par des mécanismes différents des anomalies de la microarchitecture osseuse et le développement d'ostéoporose. A l'inverse, les carences en manganèse(77), en zinc(78), en cuivre(79) semblent associées au développement d'une perte osseuse.

2) L'ostéoporose

a. Prévalence et présentation générale

L'ostéoporose correspond à une déminéralisation osseuse conduisant à des fractures de fragilité après des traumatismes à bas niveau d'énergie : elle atteint environ 50% des femmes ménopausées, plus de 20% des hommes après 50 ans (80) et près de 200 millions de personnes à travers le monde(81). Cette maladie représente un problème de santé publique majeur responsable d'une diminution de la qualité de vie(82), d'une augmentation de la mortalité(83) et d'un coût social très important(2). Selon des données récentes en France(1), le coût par habitant lié aux fractures ostéoporotiques en 2019 était de 104 euros, pour un total de 6,9 milliards d'euros (pour les fractures incidentes et les complications à long terme), soit environ 2,6% de la dépense de santé. Ce coût social important place ainsi la France au 8^{ème} rang en Europe en termes de coût de santé le plus élevé lié aux fractures ostéoporotiques par habitant. En comparaison, malheureusement, la prise en charge de cette maladie reste très insuffisante, avec seulement un tiers des patients ayant une indication thérapeutique suivant les recommandations, qui sont réellement traité(84,85), et seulement 21% de traitement chez les patientes à haut risque dans des données très récentes(1).

Le diagnostic de l'ostéoporose se fait, soit lors de la découverte d'une première fracture dite ostéoporotique, c'est-à-dire survenue après un traumatisme de faible

intensité (hors crâne, rachis cervical, scapula, sternum, doigts ou orteils), révélatrice de la maladie, soit lors de la réalisation d'une ostéodensitométrie osseuse (T-score < -2,5DS en l'absence de fracture). Outre la ménopause, de multiples causes d'ostéoporose secondaire ont été identifiées(86) : endocrinopathies (dysthyroïdie, acromégalie, hyperparathyroïdie), maladies hépato-gastro-entérologiques (maladie coeliaque, malabsorption, cirrhose hépatique), maladies génétiques (ostéogénèse imparfaite, maladie de marfan, hypophosphatasie), maladies hématologiques (thalassémies, mastocytose), causes médicamenteuses (corticothérapies, hormonothérapies).

b. Thérapeutiques utilisées dans l'ostéoporose

La prise en charge de l'ostéoporose associe différentes modalités thérapeutiques. Premièrement, la mise en place de mesures non médicamenteuses.

Tout d'abord, elles comportent, bien sûr, le maintien ou le renforcement d'une activité physique en charge. En effet, les situations d'alitement prolongé(87) ou les voyages spatiaux(88) ont mis en évidence le rôle important la stimulation mécanique en charge sur le maintien d'un remodelage osseux de bonne qualité, par l'intermédiaire principalement de l'action des ostéocytes(26). La perte de leur mécano-stimulation aboutit à une perte osseuse significative rapide avec principalement une accélération de la résorption osseuse, mais aussi une diminution de la formation osseuse(89). Les mesures conseillées sont la réalisation exercices d'intensité modérée à élevée au moins deux fois par semaine, de préférence des jours non consécutifs, avec 8 à 12 répétitions de 8 à 10 exercices(2). La mise en place de cette mesure vise aussi à limiter le risque de sarcopénie associée, et les chutes qui en découlent. La prise en charge du risque de chutes, facteur de risque majeur de fracture, en limitant les facteurs modifiables tels que la polymédication, les facteurs environnementaux (adaptation du domicile et du chaussage), ou encore la lutte contre les troubles de vision, est elle aussi primordiale dans la prise en charge globale du patient ostéoporotique(2).

Deuxièmement, la mise en place de mesures médicamenteuses est elle-aussi indispensable. Les apports de vitamine D doivent être adaptés avec pour but l'obtention d'une concentration sérique supérieure ou égale à 30ng/ml permettant de limiter le risque d'hyperparathyroïdie secondaire et l'augmentation de la résorption osseuse observée chez les patients ayant un taux de vitamine D < 30 ng/ml(90). Le

protocole de recharge sera à adapter en fonction du taux initial de 25OH Vitamine D. On fera une dose de charge avec par exemple, une ampoule de 50 000 UI toutes les semaines pendant 4 à 8 semaines (respectivement pour un dosage de vitamine D < 30 ng/ml ou < 20 ng/ml)(91). Par ailleurs, l'apport journalier de calcium, doit être compris entre 1 et 1,2 g, en privilégiant l'apport alimentaire(92) de produits laitiers et d'eau minérale riche en calcium, en réservant les suppléments médicamenteux en cas d'apports restant insuffisants. Enfin, des traitements spécifiques sont disponibles. Il en existe deux types. D'une part les inhibiteurs de la résorption osseuse (IRO), au premier rang desquels les bisphosphonates (per os ou injectables), traitements de première intention, en l'absence de contre-indication, chez la femme(2) et chez l'homme(3) et le denosumab, anticorps anti-RANKL (3). D'autre part, des médicaments ostéoformateurs qui stimulent la formation osseuse et la production ostéoblastique. Le tériparatide, fragment synthétique 1-34 de la parathormone et le Romosozumab, anticorps anti-sclérostine. Les durées de la première séquence thérapeutique varient en fonction du traitement utilisé de 18 mois pour le tériparatide à 5 ans pour un traitement par bisphosphonate per os(2,3).

II) Métabolisme du fer : Physiologie et pathologie

1) Le fer

a. Métabolisme et répartition systémique du fer

Le fer est un métal de transition essentiel pour l'organisme présent principalement sous forme ferreuse (Fe^{2+}) et ferrique (Fe^{3+}). Des oxydases et des réductases favorisent ce changement d'état d'oxydation essentiel pour sa progression dans l'organisme et ses rôles en biologie.

Le corps humain contient en moyenne 4 grammes de fer, répartis en 3 secteurs principaux : i) le fer biodisponible dans le plasma transporté par la transferrine (1 à 2 mg), ii) le fer fonctionnel constitué par l'hémoglobine (70% du fer total), la myoglobine et l'ensemble des protéines héminiques et non héminiques auxquelles il est associé, et iii) le fer de réserve représenté par la ferritine et l'hémosidérine(93).

Le fer biodisponible dans le plasma, qui est distribué aux cellules, provient de l'absorption digestive et du recyclage du fer des érythrocytes sénescents au cours du processus d'érythrophagocytose(93,94).

L'apport alimentaire journalier de fer est d'environ 10 à 20 mg, 1 à 2 mg étant principalement absorbés au niveau du duodénum, ce qui couvre les pertes quotidiennes (desquamation cellulaire, urine, hémorragies). Au niveau des villosités des entérocytes, le fer non héminique, ferrique, subit une réduction par une ferriréductase (Duodenal Cytochrome B) et peut ainsi être absorbé par un transporteur spécifique, DMT1 (Divalent Metal Transporter 1). L'absorption digestive du fer héminique est moins bien caractérisée(95). Pour autant, le fer héminique semble absorbé de façon plus efficace que la forme non héminique, représentant jusqu'à 50% du fer biodisponible(96). Le devenir du fer, une fois capté par l'entérocyte, dépend des besoins de l'organisme. Il peut être utilisé dans l'entérocyte directement ou bien être stocké au sein de la ferritine entérocytaire puis éliminé lors de la desquamation des entérocytes, ou bien encore, si du fer est nécessaire pour l'organisme, être exporté dans le plasma au niveau du pôle basal de l'entérocyte, via la ferroportine (94,95). Le fer ferreux Fe^{2+} est alors oxydé sous forme ferrique Fe^{3+} par l'héphaestine et la céruloplasmine, protéines à activité ferroxidase(97). Ce n'est que sous cette forme qu'il peut être pris en charge par la transferrine pour être transporté vers les organes et les cellules (**Figure 5**)(98).

Le processus d'érythrophagocytose permet le recyclage du fer (20mg/j environ) provenant des hématies sénescents par les macrophages. L'hémoglobine est dégradée ce qui permet la libération du fer qui va être stocké dans la ferritine macrophagique, ou bien être libérée dans le plasma par un processus mettant en jeu la ferroportine et la céruloplasmine. Le fer est ensuite pris en charge par la transferrine plasmatique sous forme de Fe^{3+} , sans doute grâce à l'action de la céruloplasmine plasmatique (99).

Une fois fixé sur la transferrine plasmatique, le fer pour être transporté vers les cellules cibles porteuses du récepteur à la transferrine permettant l'endocytose de la transferrine et du fer(99). Dans l'endosome, le pH diminue du fait de l'action de la pompe à proton, ce qui favorise la dissociation du fer de la transferrine et libère le fer sous forme ferrique. Celui-ci est ensuite réduit sous forme ferreuse par la réductase STEAP3 puis transporté dans l'espace intracellulaire par le récepteur DMT1(99).

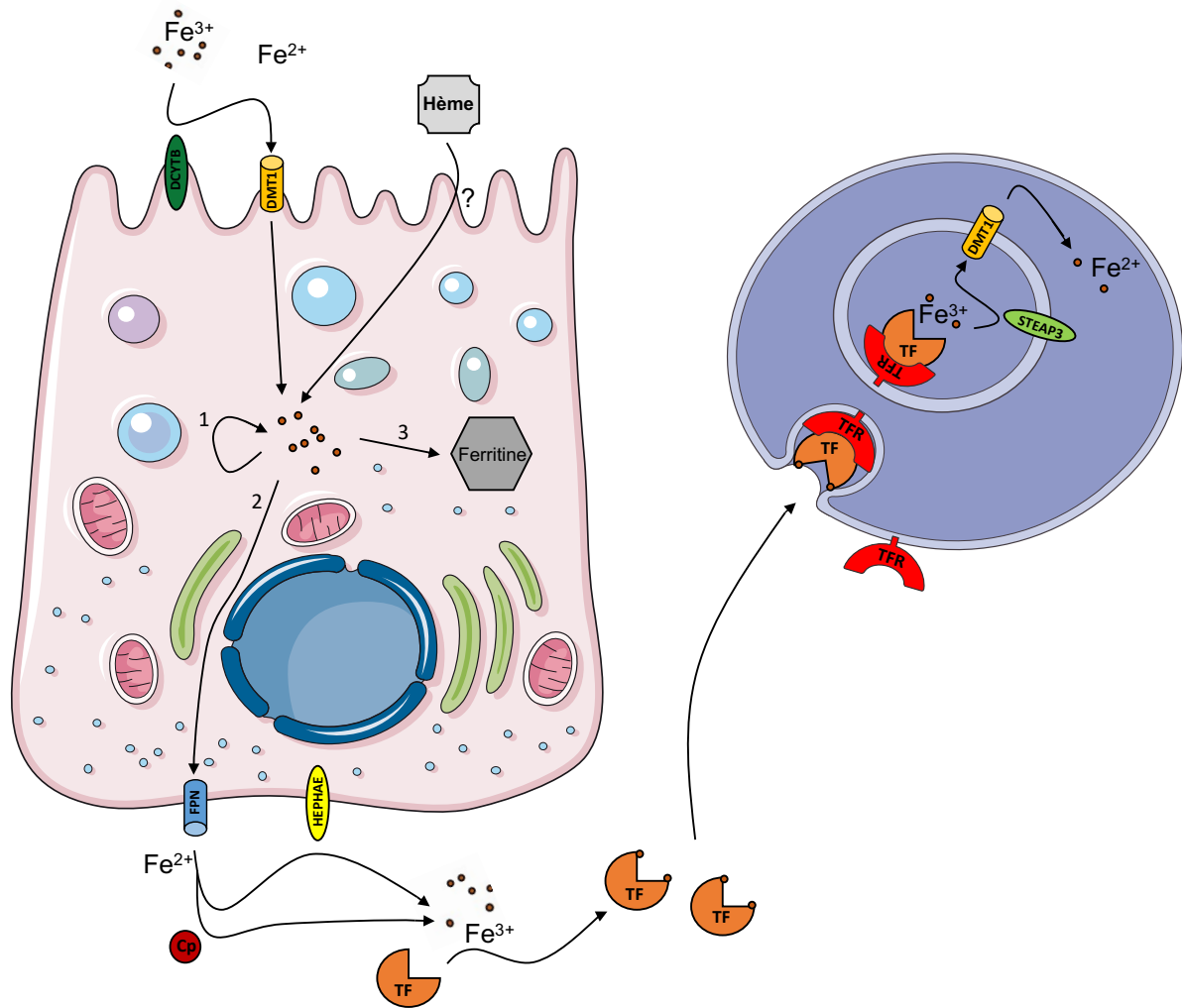


Figure 5 : Absorption digestive du fer puis captation cellulaire : Le fer non héminique est, au niveau du pôle apical de l'entérocyte, initialement réduit par le Duodenal Cytochrome B (DCYTB, ellipse vert foncé) en fer ferreux (Fe^{2+}) pouvant être absorbé par l'intermédiaire du Divalent Metal Transporter 1 (DMT1, cylindre orange) au sein de l'entérocyte. Le mécanisme d'absorption du fer héminique au niveau du pôle apical reste méconnu. Dans l'entérocyte, le fer peut être utilisé directement par la cellule (1), transféré au pôle basal (2) ou stocké sous forme de ferritine (3). Au pôle basal, le fer est exporté par la ferroportine (FPN, cylindre bleu). Il connaîtra ensuite une oxydation en fer ferrique (Fe^{3+}) par l'intermédiaire de la céruloplasmine (Cp, cercle rouge) ou l'hephaestine (HEPHAIE, ellipse jaune) afin d'être transporté par la transferrine (TF) au niveau des cellules cibles. La transferrine est ensuite captée par le récepteur de la transferrine (RTF) puis internalisée au sein d'un endosome dans lequel le fer est libéré

puis réduit par STEAP3 (ellipse vert clair) et transmis à la cellule par l'intermédiaire de DMT1.

b. Régulation systémique du métabolisme du fer

La libération du fer à partir des macrophages et des entérocytes est un processus finement régulé, permettant le maintien d'une saturation de la transferrine, reflet du fer biodisponible plasmatique, normalement entre 30 et 45%. La transferrine est une protéine produite principalement par l'hépatocyte ayant deux sites de captation de fer ferrique(100). L'acteur central de cette régulation du niveau de fer plasmatique est l'hepcidine(101). Synthétisée par l'hépatocyte et sécrétée dans le plasma, elle limite l'expression et l'activité de la ferroportine au niveau de la membrane du macrophage et au niveau du pôle basal de l'entérocyte(102). En interagissant avec cet exportateur du fer, l'hepcidine entraîne donc une diminution du fer plasmatique(103). Par ailleurs, elle peut diminuer l'expression de DMT1 au niveau du pôle apical de l'entérocyte et donc l'entrée du fer alimentaire(104). Ces deux mécanismes tendent à diminuer le fer biodisponible dans le plasma. Des anomalies de régulation de l'expression de l'hepcidine (**Figure 6**) sont à l'origine de pathologies du métabolisme du fer, en particulier de surcharges en fer. Certaines mutations régulant la cascade moléculaire de la synthèse hépatique de l'hepcidine entraînent un niveau d'hepcidine anormalement bas en regard du stock en fer, à l'origine d'une libération inadéquate de fer, et provoquent une augmentation du fer plasmatique et de la saturation de la transferrine. Une surcharge en fer se développe alors dans certains types cellulaires parenchymateux, particulièrement dans le foie, le cœur et le pancréas du fait de l'apparition de formes anormales de fer dans le plasma dont la captation par les cellules parenchymateuses ne peut être régulée. Cette situation se rencontre chez l'homme au cours des hémochromatoses génétiques(4). Lorsque les capacités de saturation de la transferrine sont dépassées, la surcharge en fer liée à l'hémochromatose est aussi associée à l'apparition de fer non lié à la transferrine (FNLT), qui vient créer des complexes avec le citrate, l'albumine ou l'acétate pour rentrer dans les cellules de manière non spécifique, pouvant entraîner un stress oxydatif tissulaire et la production de radicaux libres(105,106). La captation du FNLT

au niveau de certains tissus, notamment ceux présentant les récepteurs de la famille des Zrt- et Irt-like Protéine ZIP (SLC39A), notamment le ZIP14 (SLC39A14), qui peuvent transporter, outre le FNLT, le manganèse, le cadmium ou le zinc(107,108). Ces transporteurs sont fortement exprimés au niveau du foie, du pancréas et du cœur expliquant que ces organes sont les premières cibles de l'excès de fer(108,109).

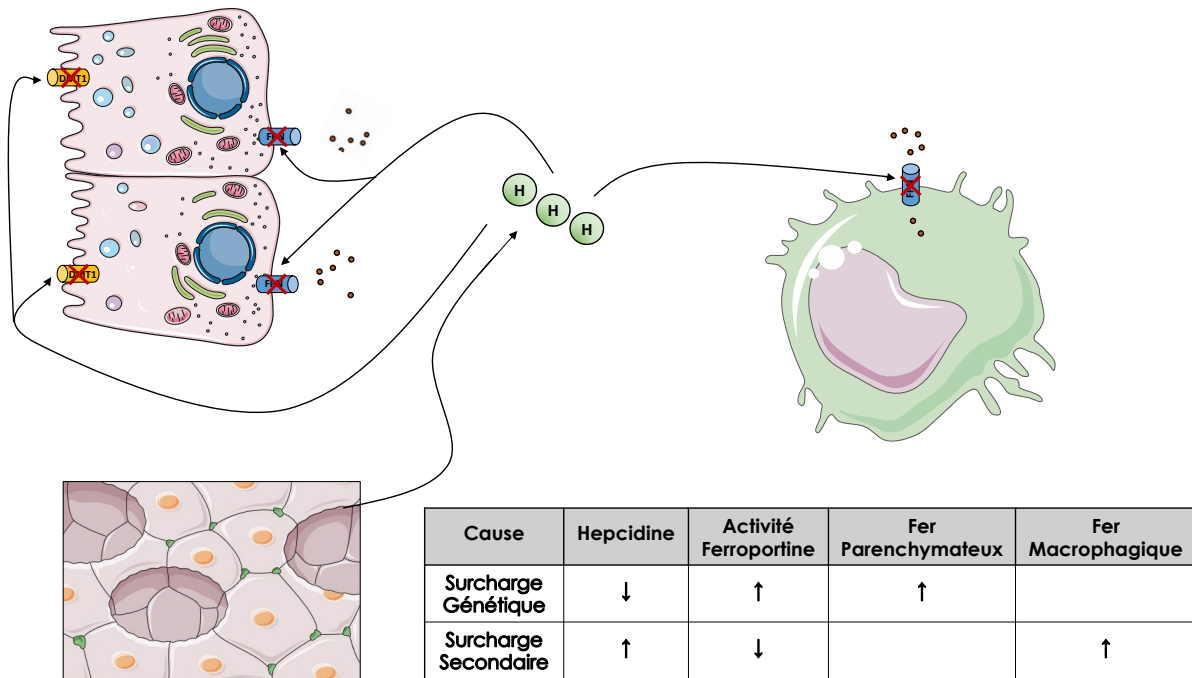


Figure 6 : L’hepcidine lors des surcharges en fer. Lorsque le niveau de fer est excessif, l’expression de l’hepcidine par les hépatocytes augmente. Son interaction avec la ferroportine va limiter l’activité d’export du fer de la ferroportine, diminuant ainsi l’absorption du fer au niveau digestif et le recyclage du fer au niveau des macrophages. L’hepcidine va aussi diminuer l’action de DMT1 au niveau du pôle apical de l’entérocyte. Au cours des surcharges génétiques en fer, le découplage entre le niveau de fer de l’organisme et l’expression de l’hepcidine qui n’est pas induite de façon adéquate fait que le fer peut continuer à arriver dans le plasma et que la saturation de la transferrine augmente, favorisant l’apparition de fer non lié à la transferrine.

L’expression du gène *HAMP* codant pour l’hepcidine est modulée par différentes situations : elle est augmentée par le fer et l’inflammation et diminuée par l’hypoxie et l’érythropoïèse(110). La régulation de l’expression d’hepcidine par le niveau de fer dans l’organisme se fait par deux mécanismes principaux. Le premier est lié au niveau de saturation de la transferrine du plasma, et implique le gène *HFE*,

codant pour une protéine de membrane, similaire aux protéines du complexe majeur d'histocompatibilité de type I, qui s'associe avec la bêta-2-microglobuline(111). *In vitro*, lorsque la saturation de la transferrine est basse, la protéine HFE est associée au récepteur de la transferrine 1 (TfR1). En cas d'augmentation, la protéine HFE se dissocie de TfR1 et vient interagir avec TfR2 ce qui favorise l'expression d'hépcidine(112). Le second mécanisme de régulation est porté par la voie BMP/Hemojuvelin (HJV)/Son of Mothers Against Decapentaplegic (SMAD). L'augmentation de la concentration en fer intra-cellulaire entraîne la production des protéines BMP2 et BMP6 par les cellules sinusoidales du foie(113,114), qui interagissent avec leur récepteur (BMPR) qui est lui-même associé à HJV. Cette interaction entraîne la production intracellulaire de SMAD 1, 5 et 8 qui transloquent dans le noyau cellulaire après association avec SMAD 4(110,115) ce qui amène l'expression d'hépcidine. BMP6 apparait donc un puissant inducteur de l'hépcidine. Les modèles d'inactivation(116) ou de neutralisation par anticorps anti-BMP6(117) entraîne ainsi une surcharge en fer importante, induite par la baisse de l'expression d'hépcidine et par la baisse de dégradation de la ferroportine qui en découle. A l'inverse, l'injection de BMP6 recombinante entraîne une diminution du taux de fer(117).

De façon importante, il faut signaler que l'inflammation provoque une augmentation de l'expression de l'hépcidine, notamment du fait des cytokines inflammatoires dont l'interleukine 6 qui va activer la voie stat3 responsable d'une augmentation de l'activité du promoteur de l'hépcidine(113,118,119). L'action biologique de l'hépcidine induit une séquestration du fer dans les macrophages et une diminution de l'absorption digestive du fer, réduisant le fer plasmatique(101,102). A l'inverse, il faut souligner que l'anémie et/ou l'hypoxie, vont réduire l'expression de l'hépcidine en mobilisant la voie de transduction liée au Hypoxia Inducible Factor(120–122).

2) Fer et pathologies

a. Les surcharges en fer

I. D'origine génétique

Les hémochromatoses génétiques sont des surcharges en fer systémiques liées à des mutations de gènes qui jouent un rôle direct dans le métabolisme du fer(4). La classification de ces maladies vient d'être récemment mise à jour(123). Les 4 types de la précédente classification ont laissé place à quatre nouvelles catégories : les hémochromatoses liées à une mutation du gène HFE (homozygotie p.Cys282Tyr, ou hétérozygotie composite), les hémochromatoses non HFE (liée à une mutation soit du gène de l'hémojuvéline (HJV), de l'hepcidine (Hepcidin AntiMicrobial Peptide (HAMP)), du récepteur à la transferrine 2 (TFR2), du gène Solute Carrier Family 40 Member 1 (SLC40A1) codant pour la ferroportine), les hémochromatoses bigéniques et les formes de causes indéterminées. Enfin, la mutation des gènes impliqués dans la voie BMP (récepteur, ligand ou facteur de transcription) va résulter en une surcharge en fer(116,117,124,125).

Le diagnostic clinique est souvent dépendant de la connaissance d'un potentiel antécédent familial permettant un dépistage précoce. En l'absence de ce type d'antécédent, les signes clinico-biologiques dépendent du temps d'évolution de la maladie et peuvent être une asthénie, une mélanodermie, des arthralgies, des troubles cardiaques, l'apparition d'un diabète ou des anomalies du bilan hépatiques(123).

La surcharge en fer dans ces différentes maladies est plutôt parenchymateuse, car entraînant une augmentation de l'activité biologique de la ferroportine, induisant donc un relargage du fer à partir du macrophage et une augmentation de l'absorption digestive du fer (**Figure 6**).

Le traitement repose principalement sur la mise en place de saignées fréquentes et répétées afin de diminuer la surcharge en fer et ses conséquences. Ce traitement est d'ailleurs extrêmement efficace pour éviter le développement de diabète, cardiopathie, de cirrhose ou de carcinome hépatocellulaire(4,126). L'efficacité des saignées sur les douleurs articulaires(126,127), la qualité de vie(128) ou les complications osseuses(4) n'a par contre jamais été prouvée.

II. D'origine secondaire

Dans les surcharges en fer d'origine secondaire, comme dans le cadre de transfusions itératives ou de supplémentation en fer, le taux d'hepcidine augmente physiologiquement en réponse à l'augmentation de la surcharge martiale, afin de

limiter le fer biodisponible dans le plasma. L'expression et l'activité biologique de la ferroportine sont ainsi diminuées, réduisant la capacité de recyclage du fer par les macrophages(101). Le fer est alors plutôt séquestré dans les macrophages et la surcharge en fer est donc macrophagique (**Figure 6**).

Dans la thalassémie, la surcharge en fer est expliquée par un double mécanisme : i) les transfusions associées à une augmentation de l'hepcidine et ii) la diminution majeure de cette hepcidine à distance des transfusions induisant une augmentation de l'absorption digestive et du relargage du fer à partir du macrophages(129).

Dans le cas des surcharges d'origine secondaire, le traitement repose sur la chélation du fer afin d'éviter sa toxicité à long terme. Trois chélateurs sont disponibles actuellement, l'un en injection sous-cutanée ou intraveineuse (la déféroxamine), et deux en prise orale (défériprone et déférasirox)(130).

b. Les carences en fer, absolues ou relatives

La carence martiale correspond à la carence nutritionnelle la plus fréquente au monde et la première cause d'anémie(131). Cette observation est, bien entendu, très variable en fonction d'un pays à l'autre mais pourrait touchée près de 1 milliard d'individus(131). Les symptômes classique en lien avec la carence martiale peuvent être très variables et peu spécifiques, associant une asthénie, une faiblesse musculaire, une fragilité des phanères ou des muqueuses, plus rarement un prurit(132,133). Les symptômes peuvent être en lien avec la cause entraînant la carence : saignements digestifs ou gynécologiques, maladie inflammatoire active, dénutrition mais aussi avec l'anémie qui en découle, notamment la dyspnée ou la souffrance myocardique ou mésentérique.

Les carences en fer peuvent être dissociées en deux grands groupes. La carence en fer absolue résultant de trois mécanismes majeurs, possiblement intriqués : une diminution des apports, une augmentation des besoins (croissance, grossesse par exemple) ou une augmentation des pertes(134) et la carence en fer fonctionnelle, notamment dans le cadre de l'inflammation chronique responsable d'une production de cytokines inflammatoires(135).

Biologiquement, dans un profil ferriprive strict, le fer sérique, la saturation de la transferrine ainsi que la ferritine sont abaissées, alors que la transferrine augmente. Dans un profil inflammatoire, le fer sérique et la saturation de la transferrine sont bas, alors que la ferritine est normale voire augmentée. La transferrine diminue(134).

Dans le cas des carences absolues, l'organisme répond en diminuant l'expression hépatique d'hépcidine ce qui renforce le rôle de la ferroportine, stimulant ainsi l'absorption digestive du fer et le recyclage des hématies sénescents(134). Pour les carences fonctionnelles, notamment l'inflammation, le problème est plutôt lié à une mauvaise répartition des réserves en fer, principalement induite par l'hyperhépcidinémie médiée par l'augmentation de l'IL6(118). Cette adaptation va entraîner une séquestration du fer, notamment au niveau macrophagique par baisse de l'activité de la ferroportine, limitant ainsi le fer biodisponible.

En cas de signe de mauvaise tolérance de l'anémie associée, le traitement d'urgence reste la transfusion de culot globulaire. Le traitement de la carence absolue repose, par ailleurs, sur l'apport de fer, soit par l'alimentation ou par apport médicamenteux, par voie per os ou intraveineuse(134), qui doit se faire en parallèle du traitement de la cause, notamment la recherche d'un saignement occulte. Pour les carences en fer fonctionnelles, notamment en lien avec l'inflammation chronique, le traitement de la maladie sous-jacente est primordial.

3) Le fer et les autres métaux

Le métabolisme du fer et ces différents acteurs présentent de nombreuses interactions avec le métabolisme d'autres métaux(104). Ces interactions peuvent interférer avec les grandes fonctions du métabolisme du fer, notamment l'absorption du fer, son transport ou sa délivrance aux cellules. En premier lieu, le transporteur DMT1 semble pouvoir avoir un rôle dans le transport d'autres cations divalents que le fer, notamment le cobalt (Co^{2+}), le manganèse (Mn^{2+}), le cadmium (Cd^{2+}), le zinc (Zn^{2+}), le nickel (Ni^{2+}), le plomb (Pb^{2+}) et le cuivre (Cu^{2+}) avec une inhibition compétitive du transport du fer par le manganèse ou le cobalt(136–139). La ferroportine, peut elle-aussi transporter d'autres métaux que le fer, notamment le zinc, le cobalt et le manganèse(140,141). Plus récemment, il a été décrit une régulation de son expression au niveau de la membrane des macrophages par la concentration en cuivre(142).

Les protéines en charge de l'oxydation du fer, notamment la céruloplasmine et l'héphaestine sont cuivre dépendantes(143), et leur action semble pouvoir être régulée par le zinc(144,145). Enfin, la protéine de transport principale du fer vers les cellules et tissus cibles, la transferrine, peut aussi interagir avec de nombreux autres métaux, comme le manganèse(146,147), le plomb(148), le bismuth(149,150), le chrome(151), le cuivre, le zinc(152), le cobalt ou le gallium(153). Ces interactions restent pourtant à nuancer, car très dépendantes de la concentration étudiée de ces métaux, qui restent faibles dans l'organisme à l'état physiologique (150,154). De plus, l'affinité des transporteurs pour ces métaux varie fortement d'un métal à l'autre pour chaque protéine. Par exemple, pour DMT1, le transport du nickel et du plomb sont probablement anecdotique par rapport à celui du fer, du zinc, du manganèse ou du cuivre(104,155). Enfin, l'hepcidine peut elle aussi interagir avec d'autres métaux. Le cuivre, le zinc et le cadmium peuvent, par exemple, moduler son expression par l'action du Metal Transcription Factor 1 (MTF1)(156).

Les différentes interactions ont été résumées dans la **Figure 7**.

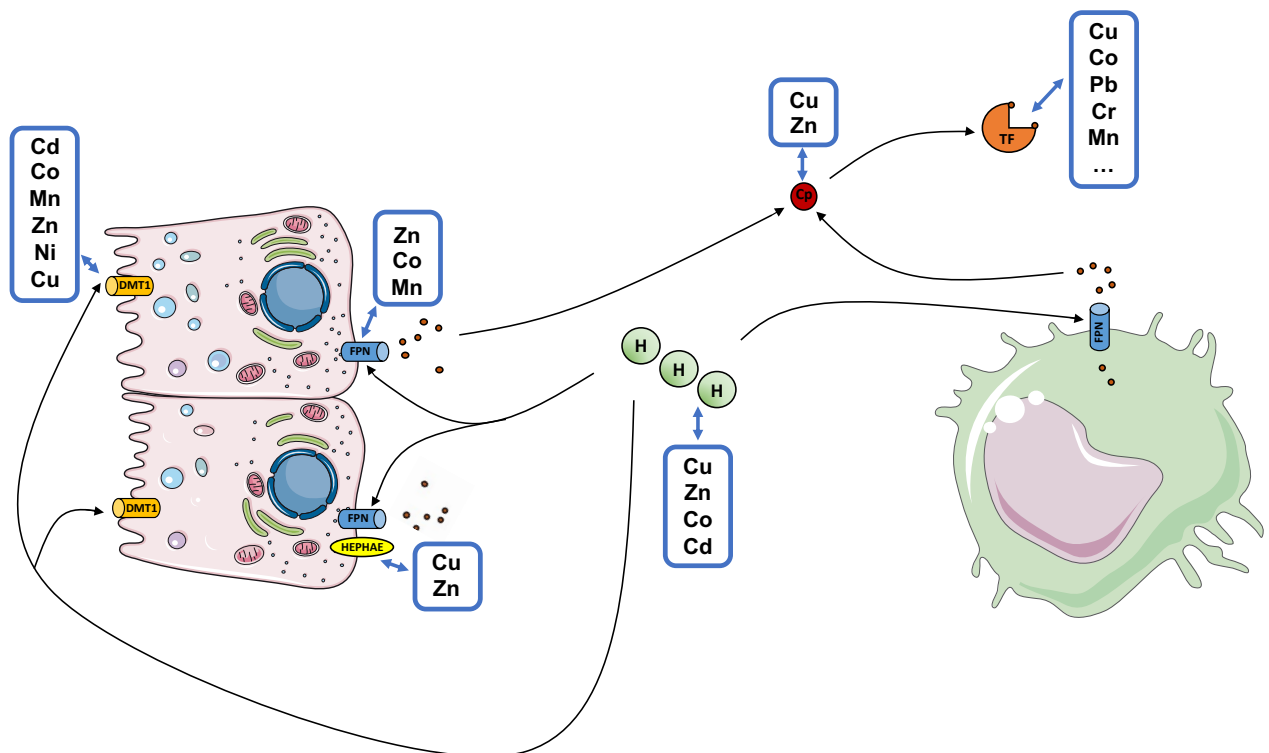


Figure 7 : Interactions entre le métabolisme du fer et les protéines agissant dans les grandes étapes de l'absorption, du recyclage et du transport du fer avec les autres métaux.

III) Ostéoporose des surcharges en fer :

1) Interaction entre le métabolisme du fer et le métabolisme osseux

Il a été montré que les surcharges en fer, qu'elles soient génétiques ou secondaires, entraînaient des altérations qualitatives et quantitatives du tissu osseux et augmentaient le risque d'ostéoporose(4,157). De plus, on observe chez les femmes ménopausées une relation positive significative entre ferritinémie sérique (reflet théorique des réserves en fer mais pouvant aussi augmenter avec d'autres mécanismes tels que l'inflammation) et ostéoporose, et ce même pour un niveau de ferritinémie considérée dans la partie haute de la normale(6). Par ailleurs, chez des rates ovariectomisées et traitées par des chélateurs du fer, il a été décrit une diminution de l'ostéoporose induite par l'ovariectomie (158).

Les mécanismes cellulaires et moléculaires expliquant cette relation entre fer et ostéoporose ne sont pas complètement élucidés. Au niveau cellulaire, la perte osseuse serait induite par un déséquilibre de la balance ostéo-formation/ostéo-résorption avec une diminution de l'activité ostéoblastique(159,160) et une augmentation de l'activité ostéoclastique(161,162). Il en résulte des anomalies de la microarchitecture osseuse, avec diminution significative du nombre des travées osseuses (Tb.N) et de leur épaisseur (Tb.Th)(161).

a. Fer et ostéoblastes

In vitro, il a été décrit que l'ostéoblaste exprimait TfR1(163), qui lui permet de capter le fer. Par l'intermédiaire de la réaction de Fenton, un excès de fer entraîne la production de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) pouvant aboutir à une diminution de la différenciation et de l'activité des ostéoblastes, avec baisse des marqueurs de la formation osseuse(160,164,165). Par ailleurs, les ROS peuvent interférer directement au niveau de la voie Wnt, en augmentant la bêta-caténine(166). Cet excès de fer va aussi altérer la survie et augmenter l'apoptose des ostéoblastes en activant la voie PI3k/Akt(167), mais aussi en augmentant l'activité de PKC- β (168). Ces deux mécanismes aboutissent à une diminution de Forkhead box transcription factor 1 (FOXO1), facteur connu pour activer la formation osseuse(169). Comme précédemment décrit par notre équipe, l'excès de fer, in vitro, va interférer avec la

fonction de l'ostéoblaste en diminuant la concentration extracellulaire de Sphingosine-1-Phosphate (S1P) et l'expression du collagène 1, et en diminuant l'expression du HedgeHog Interacting Protein-Like 2 (HHIPL2)(160,170). Ces effets du fer pourraient concourir à une diminution de l'activité des ostéoblastes et de l'ostéoblastogénèse.

b. Fer et ostéoclastes

L'ostéoclaste a, lui aussi, la capacité de capter le fer, par l'expression de TfR1 à sa membrane(162,171). Une captation de fer en excès va aboutir à l'apparition de ROS, toujours par l'intermédiaire de la réaction de Fenton, connue pour stimuler la voie Nf- κ B(172), et donc l'expression de NFKB1 et c-Fos, deux facteurs de transcription nécessaire à la différenciation ostéoclastique(173,174). Par ailleurs, l'excès de fer stimule la différenciation ostéoclastique par l'intermédiaire de l'augmentation du RANKL par différentes voies, comme l'augmentation de l'Il6(175) ou l'apoptose ostéocytaire(176). Tous ces mécanismes aboutissent à une augmentation de l'activité des ostéoclastes et de l'ostéoclastogénèse.

c. Fer et matrice osseuse

Le fer a été rapporté diminuer in vitro la croissance des cristaux d'hydroxyapatite dans un modèle acellulaire(177). Il existe peu de données sur d'éventuelles interactions entre le fer et les protéines matricielles de l'os.

2) Os et hepcidine

Le rôle de l'hepcidine dans le développement des anomalies osseuses liées aux surcharges en fer a été évoqué. In vitro, sur un modèle de cellules ostéoblastiques humaines (hFOB 1.19), l'hepcidine à des concentrations croissantes entraîne une augmentation du calcium intracellulaire(178,179) et une augmentation de la capacité de minéralisation(180). L'ajout d'hepcidine sur des cultures de cellules macrophagiques murines RAW264.7 stimule la différenciation en ostéoclastes avec augmentation de la quantité intracellulaire de fer(181). In vivo, sur modèle du poisson zèbre (zebrafish), l'invalidation de l'hepcidine, entraîne la diminution de l'expression

de la phosphatase alcaline, de ostérix, de Runx2 avec correction partielle de ces anomalies par l'injection d'hepcidine(182). Toujours chez le zebrafish, l'injection de citrate d'ammonium ferrique (FAC) aboutit à la diminution de la capacité de minéralisation qui est rétablie par l'injection d'hepcidine(183). Chez la souris, même si un mécanisme ostéoclastique a été évoqué(184), l'inactivation du gène *Hamp* aboutit à des anomalies de la microarchitecture osseuse plutôt évocatrice d'un mécanisme de dépression ostéoblastique avec diminution du BV/TV marqué surtout par la diminution du Tb.Th et du Tb.N, avec dépôts linéaires trabéculaires du fer révélés par coloration de Perls(185), proches des observations décrites dans les souris *Hfe*^{-/-}(161). Le mécanisme sous-jacent semble associé à un déséquilibre dans le métabolisme de la voie Wnt, la fixation privilégiée de la β caténine chez les souris mutées se faisant avec FOXO3a plus qu'avec T cell Factor/Lymphoid Enhancer Factor (TcF/LEF), limitant la formation osseuse en limitant la voie Wnt canonique(186). Dans les modèles induits d'ostéoporose, notamment par ovariectomie, l'injection intrapéritonéale de tamoxifène induisant l'expression d'hepcidine a un effet positif sur la masse osseuse, en améliorant le Tb.N et le Tb.Th(187). Chez l'humain, l'hepcidine sérique semble diminuée chez les patientes ménopausées ostéoporotiques (densitométriques) par rapport à une population contrôle et corrélée à la densité minérale osseuse lombaire(187).

3) Thérapeutiques envisagées

La prise en charge de l'ostéoporose induite par les surcharges en fer ne diffèrent pas de la prise en charge de l'ostéoporose en général(4). Dans l'hémochromatose génétique, où la prévalence de l'ostéopénie et de l'ostéoporose est d'environ 78% et 34% respectivement(188), comme, évoqué précédemment, le traitement par saignées et la normalisation de la ferritinémie ne semblent pas être associés à une amélioration de la masse osseuse(189). L'effet de la chélation du fer a aussi été étudiée, principalement sur des modèles animaux, que ce soit dans l'ostéoporose induite par la surcharge en fer mais aussi dans l'ostéoporose post ménopausique(190). Les chélateurs du fer auraient la capacité de stimuler la différenciation ostéoblastique et de diminuer la différenciation ostéoclastique.

CADRE et BUT DU TRAVAIL

L'ostéoporose est une maladie fréquente, responsable d'une morbi-mortalité et d'un coût social important. Elle touche classiquement les femmes ménopausées mais certaines causes secondaires, comme la surcharge en fer peuvent être aussi responsable d'une perte osseuse. Le développement d'une ostéoporose dans le cadre de la surcharge en fer, génétique ou secondaire, est un problème maintenant bien identifié mais les mécanismes inducteurs restent incomplètement élucidés. Comme décrit précédemment, le fer semblerait entraîner un déséquilibre de la balance ostéorésorption/ostéoformation en diminuant la formation osseuse et en augmentant la résorption osseuse, sans que cela puisse expliquer l'ensemble du phénotype osseux observé.

L'intérêt scientifique pour cette cause secondaire d'ostéoporose est renforcé par la description dans une population de femmes ménopausées atteintes d'ostéoporose, d'un risque de fracture semblant associé à une augmentation de la ferritinémie, bien que les valeurs restent dans le quartile supérieur de la normale(6).

Compte tenu des éléments présentés dans la synthèse introductive, l'objectif de ce travail était de préciser les mécanismes en cause dans le développement de la perte osseuse, induite par la surcharge en fer, en se concentrant sur le rôle du fer lui-même, mais aussi le rôle d'autres acteurs, comme l'hepcidine ou les autres métaux.

Nous avons ainsi développé **2 grands axes de recherche** :

- Tout d'abord, afin de préciser le rôle du fer et de l'hepcidine, nous avons utilisé :
 - Des modèles murins présentant des surcharges en fer génétiques avec hepcidino-déficience (*Hfe*^{-/-} et *Bmp6*^{-/-}) et des surcharges en fer secondaires avec hyper-hepcidinémie (injection de fer dextran).
 - Des modèles cellulaires de précurseurs ostéoblastiques ayant la capacité de minéraliser (MC3T3 sous clone 4) exposés à des concentrations croissantes en fer et en hepcidine.
 - Une cohorte clinique de patients suivis pour ostéoporose fracturaire ou densitométrie avec évaluation du fer sérique, de la ferritine et de l'hepcidine.
- En parallèle, pour évaluer le rôle des autres métaux, et leur potentielle interaction avec le métabolisme osseux, nous avons étudié :
 - Les mêmes modèles murins que décrits précédemment avec dosage par ICP-MS des métaux dans l'os.

- La même cohorte clinique avec dosage sérique des métaux d'intérêt pouvant interagir avec le métabolisme du fer et le métabolisme osseux.

RESULTATS

Article 1

Les différences de microarchitecture osseuse entre les modèles de souris génétique et de surcharge en fer secondaire suggèrent un rôle de la déficience en hepcidine dans l'ostéoporose liée au fer.

Article soumis pour publication

Les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans la survenue d'une ostéoporose associée à un excès de fer ne sont pas entièrement compris. Notre objectif dans ce travail était d'étudier les rôles respectifs du fer et de l'hepcidine dans le développement de l'ostéoporose liée à la surcharge en fer. Pour cela, nous avons utilisé des modèles *in vivo* de souris présentant une surcharge en fer génétique liée à une déficience en hepcidine (*Hfe*^{-/-} et *Bmp6*^{-/-}) ou une surcharge en fer secondaire avec augmentation de l'hepcidine secondaire à l'excès de fer. Nous avons évalué les niveaux de fer sérique et de saturation de la transferrine, l'expression hépatique du niveau d'ARNm de l'hepcidine et les concentrations de fer osseux par ICP-MS. La topographie des dépôts de fer dans l'os a été évaluée par coloration de Perls. La microarchitecture osseuse a été évaluée par micro-CT. *In vitro*, nous avons utilisé des cellules murines ostéoblastiques MC3T3, exposées au fer ammonium citrate et/ou à l'hepcidine.

Malgré une augmentation de la concentration de fer osseux dans tous les modèles de souris surchargées (surcharge génétique ou secondaire), le volume osseux/volume total (BV/TV) et l'épaisseur trabéculaire (Tb.Th) n'ont diminué de manière significative que dans le cas d'une surcharge génétique en fer, à 12 mois d'âge pour *Hfe*^{-/-} et à partir de 6 mois pour *Bmp6*^{-/-}. Les altérations de la microarchitecture osseuse dans le modèle *Bmp6*^{-/-} étaient positivement corrélées aux taux d'hepcidine (BV/TV (Rho=+0,481, p<0,05) et Tb.Th (Rho=+0,690, p<0,05). Des dépôts de fer ont été détectés dans les travées osseuses des souris *Hfe*^{-/-} et *Bmp6*^{-/-}, tandis que les dépôts de fer étaient principalement visibles dans les macrophages de la moelle osseuse en cas de surcharge en fer secondaire. Dans les cultures cellulaires MC3T3, l'exposition au fer ammonium citrate entraînait un défaut de minéralisation pour des concentrations supérieures à 5 µM, avec une diminution parallèle des niveaux d'ARNm de l'ostéocalcine, du collagène 1 et de la phosphatase alcaline.

L'hepcidine limitait l'impact du fer réduisant la diminution des niveaux d'expression du collagène 1 et de la phosphatase alcaline par rapport aux cellules non traitées au fer.

Ces données suggèrent que l'excès de fer seul ne suffit pas à induire l'ostéoporose, et que la baisse de l'hepcidine pourrait contribuer également au développement de l'ostéoporose.

Differences in bone microarchitecture between genetic and secondary iron overload mouse models suggest a role for hepcidin deficiency in iron-related osteoporosis.

François Robin¹, Daniel Chappard², Patricia Leroyer¹, Chloé Latour³, Valérie Monbet⁴, Thibault Cavey¹, Mathieu Horeau^{1,5}, Frédéric Derbré⁵, Marie-Paule Roth³, Martine Ropert^{1,6}, Pascal Guggenbuhl¹ *, Olivier Loral^{1,6} *.

¹ INSERM, Univ Rennes, INRAE, CHU Rennes, U 1241, Institut NuMeCan (Nutrition Metabolisms and Cancer), Rennes, France.

² GEROM, LHEA, IRIS-IBS Biology Institut, Angers cedex, France

³ IRSD, Univ Toulouse, INSERM, INRAE, ENVT, UPS, Toulouse, France

⁴ Univ Rennes, IRMAR, UMR 6625, F-35000 Rennes, France

⁵ Laboratory “Movement Sport and Health Sciences” EA7470, University of Rennes/ENS Rennes, France

⁶ AEM2 Platform, Univ Rennes, University Hospital, Rennes, France

*Both authors contributed equally to the manuscript

Corresponding authors:

François Robin,

16 Boulevard de Bulgarie, 35200 Rennes, France

francois.robin@chu-rennes.fr

0299284321

Authors have no conflict of interest.

ABSTRACT

Iron overload is one of the causes of secondary osteoporosis. The cellular and molecular mechanisms involved in iron-related osteoporosis are not fully understood. Our aim was to investigate the respective roles of iron and hepcidin in the development of iron overload osteoporosis. We used mice models with genetic iron overload related to hepcidin deficiency (*Hfe*^{-/-} and *Bmp6*^{-/-}) and secondary iron overload with hepcidin increase secondary to iron excess. Serum iron and transferrin saturation levels, hepatic expression of hepcidin mRNA level, and bone iron concentrations were assessed by ICP-MS and Perl's staining. Bone micro-architecture was evaluated by micro-CT. The osteoblastic MC3T3 murine cells were exposed to iron and/or hepcidin. Despite an increase of bone iron concentration in all overloaded mice model, Bone Volume/Total Volume (BV/TV) and trabecular thickness (Tb.Th) were only decreased significantly in genetic iron overload, at 12 months for *Hfe*^{-/-} and from 6 months for *Bmp6*^{-/-}. Alterations in bone microarchitecture in the *Bmp6*^{-/-} model were positively correlated with hepcidin levels (BV/TV (Rho=+0.481, p<0.05) and Tb.Th (Rho=+0.690, p<0.05). Iron deposits were detected in the bone trabeculae of *Hfe*^{-/-} and *Bmp6*^{-/-} mice, while iron deposits were mainly visible in bone marrow macrophages in secondary iron overload. In cell cultures, ferric ammonium citrate exposure resulted in the absence of mineralization for concentrations above 5 μM, with a parallel decrease in osteocalcin, collagen 1 and alkaline phosphatase mRNA levels. Hepcidin had a rescue effect for collagen 1 and alkaline phosphatase expression level decrease. Together, these data suggest that iron in excess alone is not sufficient to induce osteoporosis, and that low hepcidin levels also contribute to the development of osteoporosis.

Introduction

Iron is a transition metal, essential for oxygen transport and delivery, as well as for many enzymatic reactions due to its role in electron transfer processes. However, when present in excess, iron may induce cell toxicity, by generating reactive oxygen species during oxidative stress(1). Therefore, iron metabolism must be closely monitored to avoid either iron deficiency or iron excess.

Hepcidin, a peptide mainly secreted in plasma by hepatocytes, plays a major role in the tuning of systemic iron homeostasis. It acts by reducing the expression on cell membrane of the ferroportin protein, the only known iron exporter, especially in macrophages and enterocytes, that are the main sources of iron for plasma. It is noteworthy that abnormally low hepcidin levels cause an increase of serum iron concentration, thus contributing to the development of iron overload, especially in genetic hemochromatosis (GH) related to the HFE gene mutation (2), but also in beta-thalassemia(3).

In GH, the abnormally low level of hepcidin gene transcription in patients exhibiting the homozygous p.Cys282Tyr mutation within HFE gene is responsible for a blunted response of hepcidin expression to high iron parameters (4). In beta thalassemia, despite a major increase of iron storage induced by blood transfusions, the anemia characterizing the disease induces hypoxia and activates erythropoiesis, two factors generating negative transduction signals limiting hepcidin gene transcription, thus leading to a low level of hepcidin despite the concomitant iron overload (5).

Osteoporosis results from quantitative and qualitative bone tissue alterations consecutive to bone remodeling abnormalities, leading to a decrease in bone mineral density and damaged microarchitecture, which strongly favors the risk of fragility fractures. It is a major public health problem, increasing morbidity and mortality(6). Around the world, close to 200 million people are affected(7). The incidence of osteoporosis increases with age, especially among women after the menopause(8). However, osteoporosis can affect both genders with many causes of secondary osteoporosis, non-linked to menopause such as corticosteroids, endocrinopathies, inflammation, tobacco or alcoholism (9). Iron overload is reported being one of the

causes of secondary osteoporosis(10,11). In addition, importantly, among post-menopausal women not primarily affected by iron overload, a significant positive correlation has been reported between serum ferritin level increase - which may reflect an increase in iron storage - and osteoporosis, even when the ferritin level remained in the upper range of the normal(12). In *Hfe*^{-/-} male mice, a model mimicking the iron phenotype of human GH, iron overload induced a bone loss mimicking the human osteoporotic phenotype with low bone mass and alteration of bone microarchitecture, supporting the role of excess iron in osteoporosis(13). In addition, in oophorectomized rats, a recognized model of post-menopausal osteoporosis, iron chelators were reported to decrease the severity of osteoporosis (14).

The cellular and molecular mechanisms involved in iron-related osteoporosis are not fully understood. Importantly, physiological bone modeling and remodeling result from the activity of osteoblasts which synthesize the bone matrix and osteoclasts which degrade the bone matrix, respectively. Both activities are coordinated within the Basic Multicellular Unit (BMU), allowing the maintenance of a good quality bone. In case of iron excess, studies have reported an imbalance between bone resorption and formation, with a decrease of osteoblast and an increase of osteoclast (2,15,16). The decreased osteoblastic activity was found associated to a ferritin increase that could play a role through its ferroxidase activity(17). Other reported mechanisms could also involve the oxidative stress consecutive to iron (18). Furthermore, it has been reported that hepcidin gene invalidation may also participate to the bone microarchitecture disturbance of bone, without excluding a potential direct effect of iron, likely through decreasing osteoblastic activity(19). These observations suggest that the occurrence of osteoporosis during GH could be related to an hepcidin deficiency.

Therefore, our aim was to investigate the respective roles of iron and hepcidin in iron overload related osteoporosis by analyzing: i) two genetic iron-overload mice models consecutive to hepcidin deficiency, and ii) a secondary iron-overload mouse model, induced by iron injection, responsible for a physiological increase in hepcidin expression. In order to explore the mechanisms involved in the development of iron overload-related osteoporosis, we used an osteoblastic cell model.

Materials and Methods

Animal models

The Ethics of Animal Experiments Committee of Rennes and Toulouse approved the protocol. During experimental procedures, animals were treated in accordance with French law, and every effort was made in order to minimize suffering.

C57BL/6 *Hfe*^{-/-} male mice, which mimic human GH consecutive to hepcidin deficiency, were studied at 6 (H6M, N=10) and 12 months (H12M, N=10). Wild-type littermates of the same age (C6M and C12M, N=10 for both) were used as controls.

Six-month-old C57BL/6 male mice, obtained from Janvier Labs (Le Genest-Saint-Isle), were used to generate secondary iron-overload animals and their control groups. Iron overload was induced through a single sub-cutaneous injection of iron-dextran (1g/kg) in 2-month-old C57BL/6 male mice (iron-dextran, N=10). The control mice received dextran only (dextran, N=10), or saline solution (controls, N=10). The animals were analyzed 4 months later.

All these animals were maintained at the ARCHE facilities (UMS Biosit, Rennes) with standard conditions for temperature, atmosphere and light. The animals had free access to tap water and standard food (2018 TEKLAD 18% Protein Rodent Diet with iron content of 200 mg/kg).

CD1 *Bmp6*^{-/-} male mice, another model of iron overload related to hepcidin deficiency, were studied at 6 months (n=10). Wild-type littermates of the same age (n=10) were used as controls. All animals were maintained in animal facilities in Toulouse, with standard conditions for temperature, atmosphere and light. The animals had free access to tap water and standard food (Sniff Rodent Diet with iron content of 180 mg/kg).

Intracardial puncture was performed on anesthetized animals and blood was collected on sodium heparinate. After euthanasia, tibia, femur, spleen and liver samples were collected. All bones were dissected by the same experimenter (FR), using the same methodology. One part of the tissue samples was immediately snap-frozen in liquid nitrogen (-80°C), while the other part was fixed in 4% formaldehyde for histological study. For bone histomorphometric study, one tibia and one femur per

animal were fixed in formalin (10%), ethanol (75%) and water (15%) for the first 24 hours and conserved in pure acetone until analysis.

MC3T3 Cell cultures

We used the mouse MC3T3-E1 cells, subclone 4, a reported model for assessing osteoblastic development and bone matrix deposition in vitro (22). The culture medium was a modified Alpha Minimum Essential Medium: with ribonucleosides, deoxyribonucleosides, 2 mM L-Glutamine and 1mM sodium pyruvate, low glucose, but without acid ascorbic (GIBCO, Custom product, Catalog No. A1049001 Thermofisher). Addition of 50mL for 500mL of Fetal Calf Serum including 25 mL Eurobio serum (ref CVFSVF00-1) and 25 mL Hyclone serum (FetalClonell ref SH30066-03). Addition of antibiotics: 5mL of a mix of Penicillin and Streptomycin (ref 15070-063 Thermofisher at 5000U and 5000µg/mL) for a final concentration of 50 U/mL Penicillin and 50 µg/mL Streptomycin. For differentiation into osteoblasts and to allow the bone matrix deposition process, we added beta glycerophosphate (ref G-6251 Sigma) and ascorbic acid (ref A4544-100G Sigma) for a final concentration of 2mM and 50 µg/ml respectively. Cells were seeded in 6-well plates (9.6cm²) at 25,000 cells/3mL/well or a density of 2.6 x10³ cm². Confluence was achieved in three to five days with treatments starting at this stage. Change of medium was performed every 2 days.

When required, iron ammonium citrate was added to the basal culture medium (ref F5879 Sigma), at increasing concentrations from 1µM to 10µM (1, 2,5, 5, and 10 µM), starting from a reference solution with a concentration of 10mM. For cells not iron exposed, iron ammonium citrate solution was replaced by vehicle. Addition of hepcidin 1 (mouse) to the basal culture medium, for final concentration of 100ng/ml (Peptide institute INC, ref 4434-s). For cells not treated with hepcidin, hepcidin solution was replaced by vehicle.

Methods

Blood samples

Hemoglobin was measured with HemoCue[®] 201+. Erythrocytes and plasma were separated by centrifugation (2230g). Plasma was aliquoted and frozen at -80°C. Plasma iron and UIBC were quantified with a classic colorimetric method on the Rennes University hospital biochemistry laboratory (Cobas 8000 analyzer Roche[®]). Plasma transferrin saturation was then calculated as (plasma iron/(plasma iron + UIBC)) X100.

Iron quantification in tissues

Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS) was used to quantify iron in the tissue samples. Analyses were performed on X-Series II (Thermo Scientific[®]) on the AEM2 platform. Thus, ⁵⁶Fe was selected for acquisition. The internal standard used was rhodium (Fisher Scientific[®]), and the calibrations were performed using a multi-element solution (SCP Science[®]; Plasma Cal). Results were expressed in concentrations of iron in tissue (µg/g of tissue).

The liver, spleen, and bone (the distal part of the tibia) samples were mineralized. All samples were handled with caution to reduce environmental contamination. After a desiccation at 120°C in an incubator for twelve hours, samples were weighed with Mettler Toledo scales, with a precision near to the microgram (dry weight). Spleen and liver samples were dissolved in 1 ml of 34% nitric acid diluted to 1/2 (Fisher Chemical Optima Grade[®]), in a closed MARS 6 microwave, and then diluted 1/20 with ultra-pure water (Millipore Direct-Q 3[®]). Bone samples were dissolved in a solution containing 0.75 ml of nitric acid (67-69% Fisher Chemical Optima Grade[®]) and 0.25 ml of hydrogen peroxide (Fisher Chemical Optima Grade[®]). Microwave and dilution protocols were the same for the other tissue samples. For bones, ICP-MS analysis targeted the lower third of the right tibia, in order to avoid marrow contamination(20).

Bone characterization

The left paws of mice were used for microCT and histomorphometric analysis. The three-dimensional (3D) bone microarchitecture and bone mineral content were evaluated using micro-CT on a Skyscan 1272 X-ray computerized microtomograph (Bruker microCT, Kontich, Belgium) equipped with an X-ray tube working at 70 kV/ 142

μ A. Bone samples were transferred to an Eppendorf tube containing acetone, and polyethylene foam was used to ensure immobilization of the sample. The tube was fixed on a brass stub with plasticine and analyzed at a resolution of 3.75 μ m per pixel, rotation angle 0.2° and using a 0.5 mm aluminum filter. Reconstruction was performed with the NRecon program (release 1.6.9.18, Skyscan). 3D measurements were obtained with CtAn software (release 2.5, Skyscan). For each tibia sample, 200 section images were obtained corresponding to the cumulative height of the secondary spongiosa (1.05 mm). After segmentation, the 3D models were constructed from the stack of 2D images with a surface-rendering program (CTVol, Skyscan). Then, they were embedded in polymethylmethacrylate at 4°C to avoid enzymatic activity. Slices (7 μ m) were obtained with a heavy-duty microtome (Leica Polycut S). The bone formation and bone resorption parameters were evaluated using a semi-quantitative system comprising Summasketch III coupled with a microcomputer. The measures were performed at x200 magnification on the secondary spongiosa, located 1 millimeter under the growth cartilage. The parameters studied were: Bone Volume/Total Volume (BV/TV, in %), trabecular number (Tb.N, in mm^{-1}), trabecular thickness (Tb.Th, in μ m), trabecular spacing (Tb.Sp, in μ m), interconnectivity Index (ICI), marrow and trabecular space star volume ($V_{\text{m.space}}^*$ and V_{trab}^* respectively, in mm^3) and fractal dimension (D_M). The trabecular bone pattern factor (Tb.Pf) is based on the existence of concave surfaces and reflects connectivity. In osteoporotic bone, the perimeter of convex structures increases and the perimeter of concave structures decreases. Perls'-staining was used to localize the iron deposits in macrophages as well as inside the bone matrix as previously described(21). Goldner Trichrome staining was used to stain the osteoid tissue and was realized for the *Bmp6*^{-/-} group.

Evaluation of mineralization process in vitro

A semi-quantitative evaluation of mineralized matrix was carried out by using the Alizarin Red stain (Sigma-Aldrich, ref 122777) staining that turns the mineralized matrix to red. At the end of the cell culture, the culture medium was replaced by 4% paraformaldehyde for one night, which was replaced by cacodylate buffer until staining. For staining, 1 ml of Alizarin Red solution (40mM, pH 4.1 to 4.3) was added, kept for 20 minutes and washed with clear water to obtain the final staining.

Gene expression

Hepatic hepcidin mRNA was quantified using RT-qPCR. Total RNA from mouse liver was extracted using the NucleoSpin®8 RNA kit (Macherey-Nagel®) and the Genomic STARlet PLC (HAMILTON®). Reverse transcription was performed on one microgram of RNA according to the protocol of the Applied Biosystem® kit. The expression of hepatic hepcidin 1 genes (*Hamp*) was carried out using specific primers - forward: TTCCCAGTGTGGTATCTGTTGC, reverse: GGTCAGGATGTGGCTCTAGGC. *Hprt* gene amplification was used as a control to obtain normalization (forward: GTGTTCTAGTCCTGTGGCCATCT, reverse: GGCTCATAGTGCAAATCAAAGTCT). Real-time quantitative PCR required the use of the qPCR Master Mix Plus for SYBR® Green I (Eurogentec®) kit and the Step One Plus PLC (Real- Time PCR System - Applied Biosystems®) according to the manufacturer's instructions. The analyses were carried out in triplicate for each sample. Amplifications were also performed on RNA that had not undergone RT to be sure of the absence of contaminating genomic DNA. Results of the quantitative qPCR were analyzed using StepOne Software v2.1 (Applied Biosystem®). Results were expressed in terms of Ct (cycle threshold) or number of PCR cycles from which the fluorescent signal reached a threshold value. For both *Hamp* and *Hprt* genes, the mean Ct of the triplicates was calculated, and then, for each mouse, the Ct value of *Hamp* was subtracted from the Ct value of *Hprt* to give $-\Delta Ct$ ($-\Delta Ct = Ct\ Hprt - Ct\ Hamp$). Mean $-\Delta Ct$ values for iron-overload and control mice were compared using non-parametric tests. The results were presented as a percentage of expression relative to the reference group, i.e. $2^{-\Delta \Delta Ct} * 100$, where $-\Delta \Delta Ct = \text{mean}(-\Delta Ct)$ in iron-overload mice $-\text{mean}(-\Delta Ct)$ in control mice.

In cell cultures, specific gene (Collagen 1 (*Col1a1*), Osteocalcin (*Bglap*), Alkaline Phosphatase (*Alp*)) mRNA was quantified using RT-qPCR. Total RNA from cell layer was extracted after adjunction of QIAzol lysis reagent (Qiagen, ref 79306), using RNeasy Mini Kit (Qiagen, ref 74004). Reverse transcription was performed on one microgram of RNA according to the protocol of the Applied Biosystem® kit. The expression of collagen 1 gene was carried out using the forward CAACCTGGACGCCATCAAG and reverse CAGGTCTGACCTGTCTCCATGTT primers. The expression of osteocalcin gene was carried out using the forward

ACCTCACAGATGCCAAGCC and reverse ATCTGGGCTGGGGACTGAG primers. The expression of alkaline phosphatase was carried out using the forward CCAGAAAGACACCTTGACTGTGG and reverse TCTTGTCCGTGTCGCTCACCAT primers. *Hprt* gene amplification was used as a control to obtain normalization (forward: GTGTTCTAGTCCTGTGGCCATCT, reverse: GGCTCATAGTGCAAATCAAAGTCT). The method used was then the same as the one previously described for the in vivo results.

Western Blot

Samples containing 50-100µg of proteins were resolved on 14% SDS-PAGE. The proteins were transferred at 240 mA for 90 min onto a 0.2µm nitrocellulose membrane. Membranes were blocked with 5% BSA or nonfat dry milk in Tris-buffered saline/0.05% Tween-20 (TBST) for 1 hour at room temperature. Membranes were incubated overnight at 4°C with rabbit antiferritin-H (1:1000; Abcam – 65080) and mouse anti-HCS70 (1:5000 Santa Cruz – 7298) as loading control. Thereafter, membranes were washed with TBST and incubated for 1 hour at room temperature with infrared dye-conjugated secondary antibodies (LI-COR, Lincoln, NE). All blots were scanned, and densitometric analysis of the bands was conducted using Image Studio Software (LI-COR, Lincoln, NE).

Cell viability analysis

Hoechst stain 33342 was performed to analyze cell viability. After fixation of the cells, an addition of 50 µL of Hoechst solution (1µg/ml (Fisher scientific ref: 11544876)) was performed and left overnight at +4°C. After rinsing with PBS, the fluorescence was measured at 380 nm on Fluostar omega (BMG Labtech).

Statistical analysis

All analyses were performed using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) 28.0 software. Groups were initially compared using non-parametric Kruskal-Wallis ANOVA, followed, when appropriate, by a comparison group by group using post hoc Mann-Whitney's test. Correlation analyses were performed using Spearman's test. A p value <0.05 was considered significant.

To test the hypothesis that hepcidin treatment may correct the deleterious impact of iron exposure at each individual concentration, we used the Mann and Whitney test to compare the two conditions of culture. In order to homogenize the results between experiments, the test was performed after a normalization process. For each experiment, the value of each point, treated with iron alone or with iron and hepcidin has been expressed as percentage of the mean of the untreated condition (without iron and without hepcidin).

Results

General findings and iron parameters in mice

General morphological and biological data, as well as iron parameters of the genetic iron-overload groups (*Hfe*^{-/-} model and *Bmp6*^{-/-} model) and the secondary iron-overload group (iron-dextran model) and their respective controls are reported in Table 1.

In the genetic iron-overload model, plasma iron and plasma transferrin saturation values were significantly higher in *Hfe*^{-/-} mice aged 6 or 12 months than controls of the same age ($p < 0.001$ in all cases). Total weight and liver weight were significantly higher in controls than in *Bmp6*^{-/-} mice ($p < 0.001$ and $p < 0.05$, respectively). Plasma iron and plasma transferrin saturation were significantly higher in *Bmp6*^{-/-} mice than in control mice ($p < 0.001$).

In the secondary iron-overload model, total body weight was significantly higher in iron-dextran and dextran mice than in the physiological serum group ($p < 0.05$). Plasma iron concentrations and plasma transferrin saturation were significantly increased in the iron-dextran mice compared to both control groups ($p < 0.001$), with no significant differences between the two control groups.

Tissue iron concentrations for liver, spleen and bone are summarized in **Figure 1**.

In Hfe^{-/-} mice, the hepatic iron content (HIC) was significantly higher compared to controls, both at 6 months (C6M=245 ± 54 and H6M=1035 ± 356 µg/g of liver

($p < 0.001$) and 12 months (C12M=229 \pm 41 and H12M=846 \pm 169 $\mu\text{g/g}$ of liver ($p < 0.001$)). In *Hfe*^{-/-} mice, HIC was significantly correlated with plasma iron and plasma transferrin saturation both at 6 and 12 months ($r = +0.607$ ($p < 0.001$) and $+0.666$ ($p < 0.001$), respectively). In contrast, spleen iron concentration (SIC) was not significantly different between *Hfe*^{-/-} and wild-type mice, regardless of age (C6M=4669 \pm 1262 and H6M=5007 \pm 965 $\mu\text{g/g}$ of spleen (Non-Significant (NS)), C12M=5714 \pm 2534 and H12M=5544 \pm 2349 $\mu\text{g/g}$ of spleen (NS)). Bone iron content (BIC) of *Hfe*^{-/-} mice was increased compared to controls, the difference being significant in 12-month-old animals (C12M=31.2 \pm 10.5 and H12M=57.2 \pm 15.1 $\mu\text{g/g}$ of bone ($p < 0.05$)).

In *Bmp6*^{-/-} group, HIC was significantly higher than in wild-type controls (13650 \pm 9577 vs 837 \pm 215 $\mu\text{g/g}$ of liver ($p < 0.001$)). In contrast with *Hfe*^{-/-} group, SIC was significantly lower in *Bmp6*^{-/-} than in wild-type mice (2436 \pm 1051 $\mu\text{g/g}$ versus 6192 \pm 1781 $\mu\text{g/g}$ of spleen ($p < 0.001$)). The BIC was also higher in *Bmp6*^{-/-} mice than in controls (210 \pm 77 versus 148 \pm 108 $\mu\text{g/g}$ of bone ($p < 0.05$)).

In iron-dextran overloaded mice, HIC was significantly higher compared to control groups (iron-dextran=9262 \pm 2542, saline=258 \pm 42, dextran=229 \pm 50 $\mu\text{g/g}$ of liver ($p < 0.001$ compared to both control groups)). HIC was significantly correlated with plasma iron and transferrin saturation ($r = +0.591$ ($p < 0.001$) and $+0.617$ ($p < 0.001$) respectively). SIC was also significantly higher in the iron-dextran mice versus controls (saline=4724 \pm 1307, dextran=5693 \pm 1086 and iron-dextran=24063 \pm 4104 $\mu\text{g/g}$ of spleen ($p < 0.001$ compared to both control groups)), and was significantly correlated with plasma iron and transferrin saturation ($r = +0.540$ ($p < 0.01$) and $+0.634$ ($p < 0.001$) respectively). BIC was significantly increased in iron-dextran versus control mice (saline=87.8 \pm 55.6, dextran=76.2 \pm 20 and iron-dextran=230.6 \pm 90.6 $\mu\text{g/g}$ of bone ($p < 0.01$ in comparison with saline, $p < 0.001$ with dextran)).

In the secondary iron-overload group, BIC was almost three times higher than in the 12-month-old *Hfe*^{-/-} mice (230.6 \pm 90.6 and 57.2 \pm 15.1 $\mu\text{g/g}$ of bone respectively), and similar to BIC of *Bmp6*^{-/-} group (230.6 \pm 90.6 and 210 \pm 77 $\mu\text{g/g}$ of bone).

Hepatic hepcidin expression

In *Hfe*^{-/-} mice, the hepatic hepcidin mRNA level was slightly but not significantly lower both in 6 and 12 months mice than in their respective controls (-10% and -28% respectively). There was no significant relationship between HIC or SIC and hepatic hepcidin expression (data not shown). In *Bmp6*^{-/-} mice, the hepatic hepcidin mRNA level was strongly lowered compared to wild-type controls (-87%; p<0,001). In mice exhibiting a **secondary iron-overload**, the hepatic hepcidin level was, as expected, increased when compared to both control groups (+328% (p<0.001) and +422% (p<0.001)). In these mice, HIC and SIC were significantly correlated to hepatic hepcidin expression.

Mice Bone Phenotype

The 3D micro-CT reconstructions of the upper tibia trabecular and cortical bone, were performed for the *Hfe* group and the secondary overload model and are shown in **Figure 2**. The 3D reconstitution was not available for the *Bmp6* group. Results of the bone microarchitecture analysis are summarized in **Table 2**.

Hfe^{-/-} mice showed a decrease of BV/TV beginning at 6 months and becoming significant at 12 months compared to control mice of the same age (p=0.022). While there was no significant difference for BV/TV at 6 months, Tb.Th was significantly decreased at both 6 and 12 months among *Hfe*^{-/-} mice compared to their respective controls. Finally, there was a significant increase in the Tb.Pf index, reflecting the decrease in connectivity between bone trabeculae at 12 months among *Hfe*^{-/-} mice compared to controls. In contrast, the decrease of Tb.N and the increase of Tb.Sp were not significant. In summary, the decrease of the bone volume in *Hfe*^{-/-} mice seemed predominantly due to a decrease of bone formation rather than an increase in bone resorption. Bone parameters were not correlated with the level of hepcidin expression. There was a huge significant decrease in BV/TV in *Bmp6*^{-/-} mice compared to controls (p=0,008). Tb.Th and Tb.N were also significantly decreased in these mice compared to controls (p<0,05 each). Furthermore, there was an increase in Tb.Pf and no significant change in Tb.Sp. The decrease in BV/TV and Tb.Th at the tibia correlated positively with hepcidin level (BV/TV (Rho=+0.481, p<0.05) and Tb.Th (Rho=+0.690, p<0.05)). In summary, the decrease of the bone volume in *Bmp6*^{-/-} mice seemed also predominantly due to a decrease of bone formation rather than an increase in bone resorption. Bone parameters were correlated with the level of hepcidin expression.

In the secondary iron-overload model, despite the higher iron bone content in the iron dextran group, there was no difference between iron overloaded mice and controls for any bone parameter (BV/TV, Tb.Th, Tb.Pf, Tb.N, Tb.Sp).

As shown in Figure 3, iron deposits were detected by Perl's staining in the bone trabeculae of *Hfe*^{-/-} mice and iron excess was also present in some bone marrow macrophages, whereas only very small amounts of iron were detected in control mice and only in bone marrow, never in bone. Iron was also detected in the bone trabeculae of *Bmp6*^{-/-} mice, but not in the control group. Similarly, to findings in *Hfe*^{-/-} mice, there was some iron visible in bone marrow macrophages.

In the secondary iron-overload model, iron deposits were mainly found in bone marrow macrophages, whereas there were no significant iron deposits in trabeculae bone.

Impact of iron on metabolism and bone matrix deposition process in MC3T3 cells

As described in materials and methods, MC3T3-E1 cells produced bone matrix and is therefore a useful model for the analysis of bone metabolism. The morphology of MC3T3 cells changed as iron concentration increased, with cells appearing more ballooned at 5 and 10 μ M. Hoechst staining showed a significant decrease at 5 and 10 μ M concentrations, from day 7, and also at day 14 and 21, but not for lower concentration (**Figure 4**). The intracellular ferritin concentration increased significantly in iron treated cells compared to free iron cells as soon as day 7 (non-treated 96350 ± 4030 arbitrary unit and treated 325000 ± 5657 ($p < 0.05$)). Semi-quantitative evaluation of mineralized matrix deposit amount in culture was performed using alizarin red staining performed at day 7, day 14 and day 21 (**Figure 4**). The deposit of mineralized matrix in control non-iron supplemented MC3T3 cells started between day 7 and day 14. Mineralized matrix deposit was never visualized from 5 μ M of iron.

The expression of osteoblastic genes of interest: Collagen 1, Alkaline phosphatase and Osteocalcin are presented in **Figure 4**. The mRNA levels of the three genes decreased significantly at day 7 for iron concentrations at 10 μ M. For iron concentration of 5 μ M, there was a significant decrease of collagen 1 and phosphatase alkaline mRNA levels, whereas osteocalcin was not significantly affected. For the lowest

concentration of iron (1 and 2.5 μM), there was no significant modulation of gene expression. At day 14, only alkaline phosphatase mRNA level remained significantly decreased at 5 and 10 μM iron exposure (data not shown).

Impact of hepcidin on MC3T3 cells exposed to ferric ammonium citrate

Treatment of cell cultures with hepcidin alone in absence of iron excess (**Figure 5**) did not modify the kinetic of bone matrix deposition between day 7 and day 14, according to Alizarin red staining compared to control cultures. In the same way, the addition of hepcidin alone did not modify significantly the expression levels of osteocalcin, alkaline phosphatase and collagen 1 whatever the day.

The impact of hepcidin supplementation on the expression of collagen 1, alkaline phosphatase and osteocalcin in cell cultures exposed to iron was analyzed at day 7 and compared to cells treated with hepcidin alone or with iron alone (**Figure 6**). Hepcidin was added to MC3T3 cells exposed to increasing iron concentrations, between 1 and 10 μM , according to material and methods. Compared to non-treated cells, iron exposure (5 and 10 μM) alone induced a significant decrease in the mRNA expression of osteocalcin, alkaline phosphatase and collagen 1. At day 7, hepcidin rescued the alkaline phosphatase and collagen 1 mRNA level expression, but not osteocalcin mRNA level expression in iron treated cells regardless of iron concentration.

Discussion

Our objective was to evaluate the respective roles of iron and hepcidin in bone loss during iron overload.

For this purpose, in a first step, we used mouse models of genetic iron overload consecutive to hepcidin deficiencies and of secondary iron overload with physiologically high hepcidin level.

Hfe^{-/-} mice, one of the hepcidin deficiency model, exhibited an increase of bone iron concentration with a significant decrease in bone mass and bone microarchitecture alterations, especially a significant decrease of BV/TV and Tb.Th. In *Bmp6*^{-/-} mice, the second hepcidin deficiency model, only minimal bone abnormalities have been described so far, mainly developmental anomalies of the sternum(23–25). The *Bmp6*^{-/-} mice, in accordance with their more severe hepcidin deficiency phenotype, developed an important increase of plasma transferrin saturation and hepatic iron concentration compared to *Hfe*^{-/-} mice. Furthermore, they had a much higher iron concentration in their bones than *Hfe*^{-/-} mice. Consistently with data that we found in *Hfe*^{-/-} mice, *Bmp6*^{-/-} animals also exhibited a significant bone loss at the tibia.

Our findings on *Hfe*^{-/-} mice agree with previously reported data in which our group showed that the bone phenotype was associated with a decrease in bone formation and, to a lesser extent, an increase in bone resorption(13,16). This is in line with the vast majority of the literature of iron overload on animal(26,27) and cellular models (MC3T3 or MG63 osteoblastic cells) (15,28–30). However, this contrasts with one study(31) where there was no decrease of BV/TV and no alteration of bone microarchitecture (femur and vertebra) in *Hfe*^{-/-} mice at 11, 29 and 53 weeks of age, compared to wild-type controls of the same age. We identified a few differences that could explain at least in part these discrepancies. First, mice used in this study were both male and female, whereas we studied only males. In addition, bone evaluation was not carried out at the same site. In the paper of Wagner and al., distal femur was studied *versus* upper end of tibia in our study. In addition, measurement methods are quite different at these two sites, with in particular a shape of the growth plate more complex in distal femur compared with the proximal tibia(32). Notably, it has been recently reported in a microgravity model that there were significant differences between bone sites for the rate of bone loss in animals, which, in this specific model,

was more severe at the tibia than at the femur(33). Interestingly, another group did not find any decrease in BV/TV in the femur of *Hfe*^{-/-} mice between 10 and 14 weeks of age(34). In our study, we evaluated only the tibia of *Hfe*^{-/-} mice, not the femur, thus preventing direct comparison. A recent report also showed a significant bone loss in 6-month-old *Hfe*^{-/-} male mice fed an iron-enriched diet(35), whereas this diet alone was not sufficient to induce bone loss in wild-type overloaded mice. In the present study, the diet was not iron-enriched and bone loss became significant at 12 months in *Hfe*^{-/-} mice, as was observed in our previous studies(13). Together, these data and reports suggest the possible role of the diet iron content as a cofactor to accelerate the bone loss in the context of genetic iron overload consecutive to hepcidin deficiency. In addition, iron excess localization may not be similar in the different models and the genetic background could influence the depth and the rate of iron overload development.

In iron-dextran mice, the secondary iron overload model, the increase in bone iron content was very important compared to controls. It was three-fold higher than that found in the *Hfe*^{-/-} mice, and quite close to the bone iron concentrations found in *Bmp6*^{-/-} mice. Unexpectedly, in contrast with both hepcidin deficiency models, iron-dextran overloaded mice did not show any significant decrease in bone mass nor alteration of bone microarchitecture. The results of our iron-dextran model did not match results previously reported with pigs overloaded with intravenous iron-dextran. Pigs had a decrease in bone mass and bone formation(26). It is noteworthy that in this study, iron injections were repeated daily for 36 days in young growing pigs, whereas in our study, only one injection (1g/kg) was performed in adult mice at two months of age, the observation being performed 4 months later. Thus, in pigs, the impact of iron excess during growth could have been a confounding factor. Iron-dextran was also previously used in a rat model, with a significant decrease of bone volume (BV/TV). In this study by Kudo et al., bone mass and quality were assessed on femur by dual energy absorptiometry, which is less accurate than histomorphometric measurements(36).

Taken together, our in vivo data, especially those obtained in the iron dextran model with animals exhibiting a severe iron overload, suggest that the role of iron excess alone in the occurrence of iron related osteoporosis is questionable and that it is necessary to consider possible additional mechanisms.

Notably, the topographical distribution of bone iron deposits varied according to the pathophysiological mechanism of iron overload. Indeed, as previously described(13), we found that iron deposits in the *Hfe*^{-/-} mice were mainly located on the trabecular bone surface and in the bone matrix. We made the same observation in the *Bmp6*^{-/-} model. Conversely, in the secondary iron overload model, no iron deposit was seen in the bone matrix with Perl's staining and iron was only visible in bone marrow macrophages. Such differences in the location of iron deposits may well explain the differences seen in bone phenotype between the mouse groups studied here.

It has already been shown, in a model of bone marrow cells isolated from femurs and tibiae of 6- to 8-week-old C57Bl/6J mice, that the addition of iron chloride, iron sulfate and ferric ammonium citrate at concentrations between 0 and 40 μ M, altered the hematopoietic precursor differentiation process, with a switch toward a macrophage-like phenotype instead of mature osteoclast(37). Therefore, one hypothesis could be that the accumulation of iron in bone marrow induced by iron-dextran injection would first target macrophages and decrease the number of differentiated mature osteoclasts, thus limiting the consequences of the bone remodeling on bone mass and microarchitecture.

The exact role of the HFE and BMP6 genes in the development of osteoporosis related to hemochromatosis remains to be evaluated.

The proposed mechanism to explain hepcidin deficiency downstream *Hfe* gene invalidation in mice was a decrease activation of the Erk/MAPK signaling pathway and, to a lesser extent of the BMP/Smad pathway(38). Alterations in these signaling pathways in *Hfe*^{-/-} animals could directly contribute to the development of bone loss. Indeed, these intracellular pathways depend on the TGF β family ligands that are very important in bone modeling and remodeling. The dependent Smad canonical pathway or the independent Smad non-canonical pathway both activate the transcription of Runx2, an essential gene in the control of the differentiation of the mesenchymal precursors into osteoblast(39). In *Bmp6*^{-/-} mice, the lack of BMP6 activity on osteogenesis seems to be functionally compensated by BMP2(23), which in addition is known to increase the expression of hepcidin(40). Moreover, in a rat model of bone loss induced by ovariectomy, regular administration of Bmp6 allowed the maintenance of bone mass over time by decreasing osteoclast activity and stimulating osteoblast activity(41). This underlines, if necessary, the pivotal role of BMP6 and BMP2 in bone

formation. Therefore, the lack of BMP6 itself could participate to the phenotype of bone loss.

We also hypothesized that hepcidin could be an important factor for the bone phenotypic difference between our models. Indeed, genetic models have a blunted hepcidin regulation in response to iron, with abnormally low level of hepcidin regarding the iron excess whereas in iron dextran model there is an adapted response to iron excess with an increase of hepcidin expression. These findings could greatly contribute to the fact that iron is deposited mainly in bone tissue matrix in hepcidin deficient mice models. Indeed, during hepcidin deficiency, iron release from macrophages/osteoclasts within the bone could be excessive, as a mirror picture of what is observed in splenic macrophages(5), contributing to this specific pattern of iron deposition. Conversely, in the iron-dextran model, high hepcidin levels could prevent iron release from macrophages/osteoclasts thus avoiding significant iron deposition in bone matrix.

In our study, the genetic overload models with low hepcidin levels were associated with a significant bone loss whereas the secondary overload model with high level of hepcidin had a normal bone. Furthermore, modifications in bone microarchitecture in the *Bmp6*^{-/-} model are positively correlated with hepcidin levels. Importantly, hepcidin deficiency has been reported to promote, *in vitro*, osteoclastic activity (42). The invalidation of the hepcidin gene induced bone damages with decreased bone formation and changes in microarchitecture, with a thinning of the bone trabeculae and decreased BV/TV in a murine model as we have found with a phenotype of osteoblast function decrease. Interestingly, the iron deposition by Perls staining in this model was linear along the bone trabeculae, and very similar to that we found in the *Bmp6*^{-/-} and *Hfe*^{-/-} mice(19).

In order to evaluate the respective roles of hepcidin and iron, we investigated their impact on the mouse MC3T3 cells, which are mineralizing osteoblast precursors, thus giving us the opportunity to evaluate bone formation process. In MC3T3 cells, we found that the addition of hepcidin was counteracting the effects of iron by limiting the drop in the mRNA levels of the principal component of the bone matrix, collagen 1, and of the bone formation markers such as alkaline phosphatase and osteocalcin.

Noteworthy, hepcidin had no impact on these mRNA levels in the absence of iron supplementation.

Conclusions

Our data showed that genetic and exogenous iron overload in mice lead to iron overload and increase iron levels in bone. However, only genetic overload induced by hepcidin deficiency in *Hfe*^{-/-} and *Bmp6*^{-/-} mice led to iron accumulation in the bone matrix, decreased bone mass and altered bone microarchitecture. Heparin limited the decrease in bone formation markers in iron treated cells. This suggests that iron in excess alone is not sufficient to induce osteoporosis, and that low hepcidin levels could play a role in genetic hemochromatosis related osteoporosis.

References

1. Galaris D, Barbouti A, Pantopoulos K. Iron homeostasis and oxidative stress: An intimate relationship. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* déc 2019;1866(12):118535.
2. Guggenbuhl P, Brissot P, Loréal O. Miscellaneous non-inflammatory musculoskeletal conditions. *Haemochromatosis: the bone and the joint. Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2011;25(5):649-64.
3. Wong P, Fuller PJ, Gillespie MT, Milat F. Bone Disease in Thalassemia: A Molecular and Clinical Overview. *Endocr Rev.* août 2016;37(4):320-46.
4. Andrews NC. Disorders of iron metabolism. *N Engl J Med.* 23 déc 1999;341(26):1986-95.
5. Ganz T. Heparin and iron regulation, 10 years later. *Blood.* 28 avr 2011;117(17):4425-33.
6. Leboime A, Confavreux CB, Mehse N, Paccou J, David C, Roux C. Osteoporosis and mortality. *Joint Bone Spine.* déc 2010;77:S107-12.
7. Reginster JY, Burlet N. Osteoporosis: A still increasing prevalence. *Bone.* févr 2006;38(2):4-9.
8. Briot K, Roux C, Thomas T, Blain H, Buchon D, Chapurlat R, et al. 2018 update of French recommendations on the management of postmenopausal osteoporosis. *Joint Bone Spine.* oct 2018;85(5):519-30.
9. Fitzpatrick LA. Secondary Causes of Osteoporosis. *Mayo Clin Proc.* mai 2002;77(5):453-68.
10. Guggenbuhl P, Deugnier Y, Boisdet JF, Rolland Y, Perdriger A, Pawlotsky Y, et al. Bone mineral density in men with genetic hemochromatosis and HFE gene mutation. *Osteoporos Int.* déc 2005;16(12):1809-14.
11. Nguyen CD, Morel V, Pierache A, Lion G, Cortet B, Flipo RM, et al. Bone and joint complications in patients with hereditary hemochromatosis: a cross-sectional study of 93 patients. *Ther Adv Musculoskelet Dis.* janv 2020;12:1759720X2093940.
12. Kim BJ, Lee SH, Koh JM, Kim GS. The association between higher serum ferritin level and lower bone mineral density is prominent in women ≥ 45 years of age (KNHANES 2008-2010). *Osteoporos Int J Establ Result Coop Eur Found Osteoporos Natl Osteoporos Found USA.* 2013;24(10):2627-37.
13. Guggenbuhl P, Fergelot P, Doyard M, Libouban H, Roth MP, Gallois Y, et al. Bone status in a mouse model of genetic hemochromatosis. *Osteoporos Int J Establ Result Coop Eur Found Osteoporos Natl Osteoporos Found USA.* août 2011;22(8):2313-9.
14. Liu G, Men P, Kenner GH, Miller SC. Age-associated iron accumulation in bone: implications for postmenopausal osteoporosis and a new target for prevention and treatment by chelation. *Biometals Int J Role Met Ions Biol Biochem Med.* juin 2006;19(3):245-51.
15. Doyard M, Fatih N, Monnier A, Island ML, Aubry M, Leroyer P, et al. Iron excess limits HHIPL-2 gene expression and decreases osteoblastic activity in human MG-63 cells. *Osteoporos Int.* oct 2012;23(10):2435-45.
16. Doyard M, Chappard D, Leroyer P, Roth MP, Loréal O, Guggenbuhl P. Decreased Bone Formation Explains Osteoporosis in a Genetic Mouse Model of Hemochromatosis. *PLoS One.* 2016;11(2):e0148292.

17. Zarjou A, Jeney V, Arosio P, Poli M, Zavaczki E, Balla G, et al. Ferritin ferroxidase activity: a potent inhibitor of osteogenesis. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res*. janv 2010;25(1):164-72.
18. D'Amelio P, Cristofaro MA, Tamone C, Morra E, Di Bella S, Isaia G, et al. Role of iron metabolism and oxidative damage in postmenopausal bone loss. *Bone*. déc 2008;43(6):1010-5.
19. Shen GS, Yang Q, Jian JL, Zhao GY, Liu LL, Wang X, et al. Hcpidin1 knockout mice display defects in bone microarchitecture and changes of bone formation markers. *Calcif Tissue Int*. juin 2014;94(6):632-9.
20. Scheller EL, Doucette CR, Learman BS, Cawthorn WP, Khandaker S, Schell B, et al. Region-specific variation in the properties of skeletal adipocytes reveals regulated and constitutive marrow adipose tissues. *Nat Commun*. 6 août 2015;6:7808.
21. Chappard D, Mabileau G, Moukoko D, Henric N, Steiger V, Le Nay P, et al. Aluminum and iron can be deposited in the calcified matrix of bone exostoses. *J Inorg Biochem*. nov 2015;152:174-9.
22. Quarles LD, Yohay DA, Lever LW, Caton R, Wenstrup RJ. Distinct proliferative and differentiated stages of murine MC3T3-E1 cells in culture: An in vitro model of osteoblast development. *J Bone Miner Res*. 3 déc 2009;7(6):683-92.
23. Solloway MJ, Dudley AT, Bikoff EK, Lyons KM, Hogan BL, Robertson EJ. Mice lacking Bmp6 function. *Dev Genet*. 1998;22(4):321-39.
24. Andriopoulos B, Corradini E, Xia Y, Faasse SA, Chen S, Grgurevic L, et al. BMP6 is a key endogenous regulator of hepcidin expression and iron metabolism. *Nat Genet*. avr 2009;41(4):482-7.
25. Meynard D, Kautz L, Darnaud V, Canonne-Hergaux F, Coppin H, Roth MP. Lack of the bone morphogenetic protein BMP6 induces massive iron overload. *Nat Genet*. avr 2009;41(4):478-81.
26. de Vernejoul MC, Pointillart A, Golenzer CC, Morieux C, Bielakoff J, Modrowski D, et al. Effects of iron overload on bone remodeling in pigs. *Am J Pathol*. sept 1984;116(3):377-84.
27. Rauner M, Baschant U, Roetto A, Pellegrino RM, Rother S, Salbach-Hirsch J, et al. Transferrin receptor 2 controls bone mass and pathological bone formation via BMP and Wnt signalling. *Nat Metab*. janv 2019;1(1):111-24.
28. Messer JG, Kilbarger AK, Erikson KM, Kipp DE. Iron overload alters iron-regulatory genes and proteins, down-regulates osteoblastic phenotype, and is associated with apoptosis in fetal rat calvaria cultures. *Bone*. nov 2009;45(5):972-9.
29. Yamasaki K, Hagiwara H. Excess iron inhibits osteoblast metabolism. *Toxicol Lett*. déc 2009;191(2-3):211-5.
30. Yang Q, Jian J, Abramson SB, Huang X. Inhibitory effects of iron on bone morphogenetic protein 2-induced osteoblastogenesis. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res*. juin 2011;26(6):1188-96.
31. Wagner A, Alan B, Yilmaz D, Ahmad M, Liu P, Tangudu NK, et al. Despite Genetic Iron Overload, Hfe-Hemochromatosis Mice Do Not Show Bone Loss. *JBMR Plus*. sept 2019;3(9):e10206.
32. Erben RG, Glösmann M. Histomorphometry in Rodents. In: Idris AI, éditeur. *Bone Research Protocols* [Internet]. New York, NY: Springer New York; 2019 [cité 4 juill 2022]. p. 411-35. (Methods in Molecular Biology; vol. 1914). Disponible sur: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-8997-3_24
33. Coulombe JC, Sarazin BA, Mullen Z, Ortega AM, Livingston EW, Bateman TA, et al. Microgravity-induced alterations of mouse bones are compartment- and site-

specific and vary with age. *Bone*. oct 2021;151:116021.

34. Ledesma-Colunga MG, Baschant U, Fiedler IAK, Busse B, Hofbauer LC, Muckenthaler MU, et al. Disruption of the hepcidin/ferroportin regulatory circuitry causes low axial bone mass in mice. *Bone*. août 2020;137:115400.

35. Simão M, Camacho A, Ostertag A, Cohen-Solal M, Pinto IJ, Porto G, et al. Iron-enriched diet contributes to early onset of osteoporotic phenotype in a mouse model of hereditary hemochromatosis. *PloS One*. 2018;13(11):e0207441.

36. Kudo H, Suzuki S, Watanabe A, Kikuchi H, Sassa S, Sakamoto S. Effects of colloidal iron overload on renal and hepatic siderosis and the femur in male rats. *Toxicology*. 18 avr 2008;246(2-3):143-7.

37. Xie W, Lorenz S, Dolder S, Hofstetter W. Extracellular Iron is a Modulator of the Differentiation of Osteoclast Lineage Cells. *Calcif Tissue Int*. mars 2016;98(3):275-83.

38. Wu XG, Wang Y, Wu Q, Cheng WH, Liu W, Zhao Y, et al. HFE interacts with the BMP type I receptor ALK3 to regulate hepcidin expression. *Blood*. 21 août 2014;124(8):1335-43.

39. Komori T. Regulation of Proliferation, Differentiation and Functions of Osteoblasts by Runx2. *Int J Mol Sci*. 4 avr 2019;20(7):1694.

40. Chen H, Choesang T, Li H, Sun S, Pham P, Bao W, et al. Increased hepcidin in transferrin-treated thalassemic mice correlates with increased liver BMP2 expression and decreased hepatocyte ERK activation. *Haematologica*. mars 2016;101(3):297-308.

41. Simic P, Culej JB, Orlic I, Grgurevic L, Draca N, Spaventi R, et al. Systemically Administered Bone Morphogenetic Protein-6 Restores Bone in Aged Ovariectomized Rats by Increasing Bone Formation and Suppressing Bone Resorption. *J Biol Chem*. sept 2006;281(35):25509-21.

42. Sun L, Guo W, Yin C, Zhang S, Qu G, Hou Y, et al. Hepcidin deficiency undermines bone load-bearing capacity through inducing iron overload. *Gene*. juin 2014;543(1):161-5.

Tables and Figures legends

| Parameters (Units) | <i>Hfe</i> ^{-/-} Model | | | | <i>Bmp6</i> ^{-/-} Model | | Secondary Iron Overload Model | | |
|----------------------------|---------------------------------|---------------|--------------|--------------|----------------------------------|----------------------------|-------------------------------|---------------|----------------|
| | C6M | H6M | C12M | H12M | WT | <i>Bmp6</i> ^{-/-} | Saline | Dextran | Iron-dextran |
| Body weight (g) | 32.78 ± 3.05 | 31.84 ± 2.51 | 34.69 ± 3.03 | 33.17 ± 2.87 | 43.80 ± 4.67 | 32.45 ± 3.58** | 30.97 ± 1.47 | 32.77 ± 1.99* | 32.25 ± 1.47* |
| Liver weight (g) | 1.52 ± 0.14 | 1.52 ± 0.10 | 1.61 ± 0.23 | 1.56 ± 0.22 | 1.73 ± 0.26 | 1.53 ± 0.18* | 1.45 ± 0.16 | 1.58 ± 0.13 | 1.97 ± 0.25** |
| Spleen weight (g) | 0.11 ± 0.02 | 0.11 ± 0.02 | 0.11 ± 0.02 | 0.1 ± 0.01 | 0.11 ± 0.01 | 0.1 ± 0.02 | 0.11 ± 0.03 | 0.1 ± 0.02 | 0.14 ± 0.04* |
| Plasma Iron (μmol/l) | 18.56 ± 2.26 | 29.14 ± 6.1** | 21.38 ± 2.92 | 33.8 ± 5.2** | 26.70 ± 4.22 | 58.54 ± 7.18** | 15.87 ± 2.49 | 15.18 ± 2.16 | 25.55 ± 6.43** |
| Transferrin saturation (%) | 38.9 ± 5.3 | 72.2 ± 15.4** | 37.6 ± 5.5 | 65.7 ± 9.4** | 50.4 ± 10.7 | 98.8 ± 2.1** | 34.1 ± 7.3 | 32.7 ± 5.7 | 63.4 ± 18.3** |

Table 1: Morphological and iron metabolism data of genetic and secondary iron overload models. *p<0,05 **p<0,001. C6M: 6-month-old wild-type mice, C12M: 12-month-old wild-type mice, H6M: 6-month-old *Hfe*^{-/-} mice, H12M: 12-month-old *Hfe*^{-/-} mice, WT: Wild-Type. The reported statistics are means +/- standard deviations.

| Parameters (Units) | <i>Hfe</i> ^{-/-} Model | | | | <i>Bmp6</i> ^{-/-} Model | | Secondary Iron Overload Model | | |
|--------------------------|---------------------------------|--------------|--------------|---------------|----------------------------------|----------------------------|-------------------------------|--------------|--------------|
| | C6M | H6M | C12M | H12M | WT | <i>Bmp6</i> ^{-/-} | Saline | Dextran | Iron-dextran |
| BV/TV (%) | 15.15 ± 4.41 | 10.46 ± 2.64 | 9.17 ± 1.93 | 5.89 ± 1.81 * | 9.56 ± 3.55 | 5.11 ± 2.02 * | 15.49 ± 2.96 | 16.00 ± 3.35 | 15.19 ± 4.29 |
| Tb.Pf | 18.62 ± 5.51 | 23.86 ± 6.01 | 20.80 ± 2.41 | 32.9 ± 4.9 ** | 23.42 ± 5.95 | 35.43 ± 6.14 * | 16.36 ± 2.42 | 16.61 ± 3.02 | 18.63 ± 5.96 |
| Tb.Th (µm) | 25 ± 3 | 23 ± 3 * | 26 ± 2 | 19 ± 1 ** | 50 ± 3 | 41 ± 4 ** | 25 ± 1 | 24 ± 1 | 24 ± 2 |
| Tb.N (mm ⁻¹) | 5.92 ± 1.29 | 4.55 ± 0.61 | 3.49 ± 0.50 | 2.98 ± 0.73 | 1.94 ± 0.78 | 1.23 ± 0.47 * | 6.18 ± 0.96 | 6.49 ± 1.02 | 6.16 ± 1.31 |
| Tb.Sp (µm) | 154 ± 51 | 201 ± 31 | 265 ± 37 | 335 ± 86 | 303 ± 91 | 339 ± 86 | 142 ± 34 | 134 ± 26 | 146 ± 41 |

Table 2: Bone parameters of genetic and secondary iron overload models. *p<0,05
**p<0,001. C6M: 6-month-old wild-type mice, C12M: 12-month-old wild-type mice,
H6M: 6-month-old *Hfe*^{-/-} mice, H12M: 12-month-old *Hfe*^{-/-} mice, WT: Wild-Type. BV/TV:
Bone Volume/Total Volume, Tb.Pf: Trabecular Patern Factor, Tb.Th: Trabecular
Thickness, Tb.N: Trabecular Number, Tb.Sp: Trabecular Spacing. The reported
statistics are means +/- standard deviations.

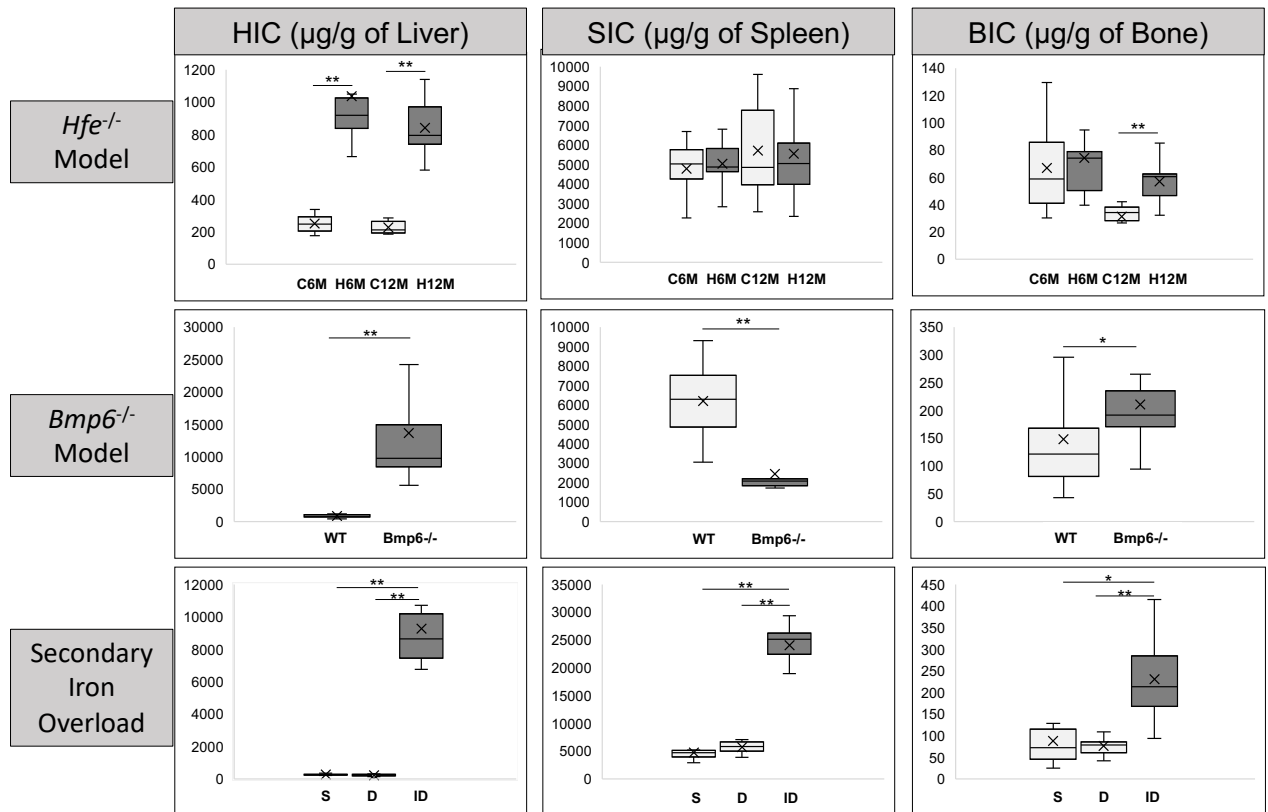


Figure 1: Quantification of iron in different organs by type of iron overload. Bone analysis (BIC: bone iron content, HIC: liver iron content, SIC: spleen iron content). * $p < 0,05$ ** $p < 0,001$. C6M: 6-month-old wild-type mice, C12M: 12-month-old wild-type mice, H6M: 6-month-old *Hfe*^{-/-} mice, H12M: 12-month-old *Hfe*^{-/-} mice, WT: Wild-Type, S: Saline, D: Dextran, ID: Iron Dextran.

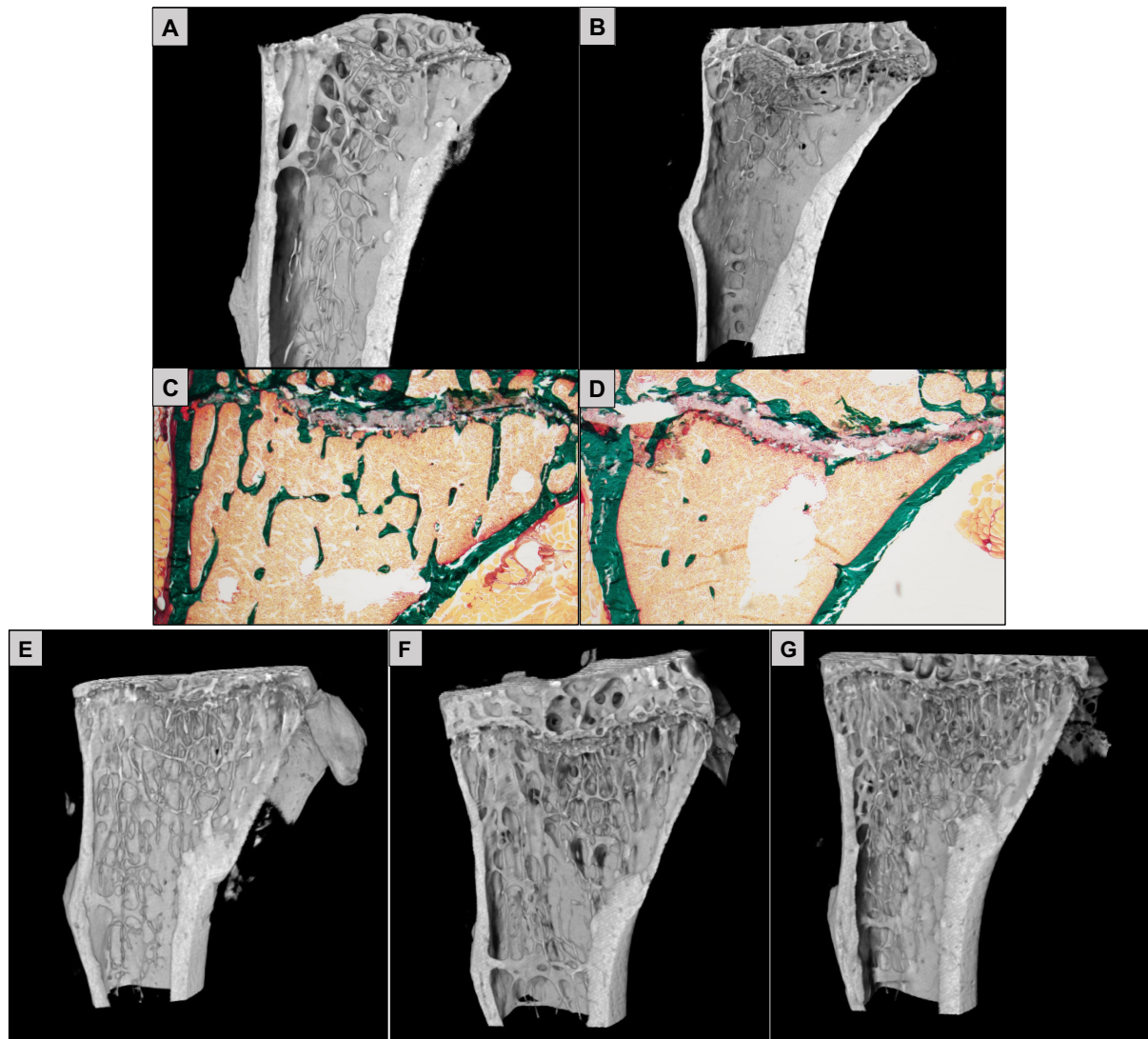


Figure 2: MicroCT and goldner stain analysis of the proximal tibial region in both types of iron overload, genetic (*Hfe* and *Bmp6*^{-/-}) and secondary to iron dextran injection. Evidence of bone loss exclusively in the genetic overload models compared to their respective controls. No bone loss in the secondary overload compared to their controls. A: 12-month-old wild-Type control, B: 12-month-old *Hfe*^{-/-} mice, C: 6-month-old wild-type mice, D: 6-month-old *Bmp6*^{-/-} mice, E: 6-month-old mice saline treated, F: 6-month-old dextran treated, G: 6-month-old iron-dextran treated.

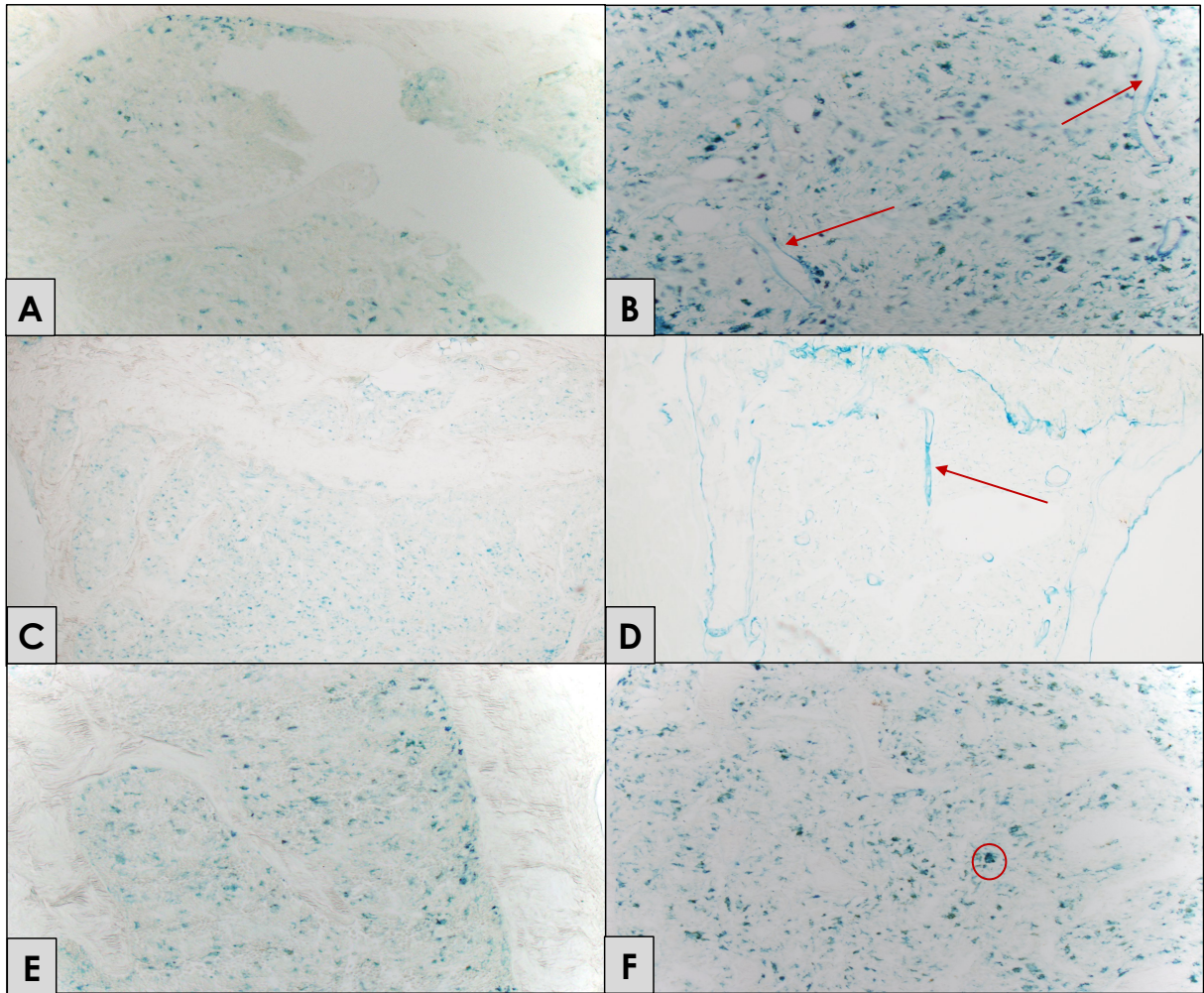


Figure 3: Perls staining of the proximal region of the tibias. Deposits along the bone trabeculae (red arrow) in the context of genetic overload (*Hfe* and *Bmp6*^{-/-}). Deposits rather intracellular (red circle) in the secondary overload model. A: 12-month-old wild-type control, B: 12-month-old *Hfe*^{-/-} mice, C: 6-month-old wild-type mice, D: 6-month-old *Bmp6*^{-/-} mice, E: 6-month-old mice saline treated, F: 6-month-old iron-dextran treated.

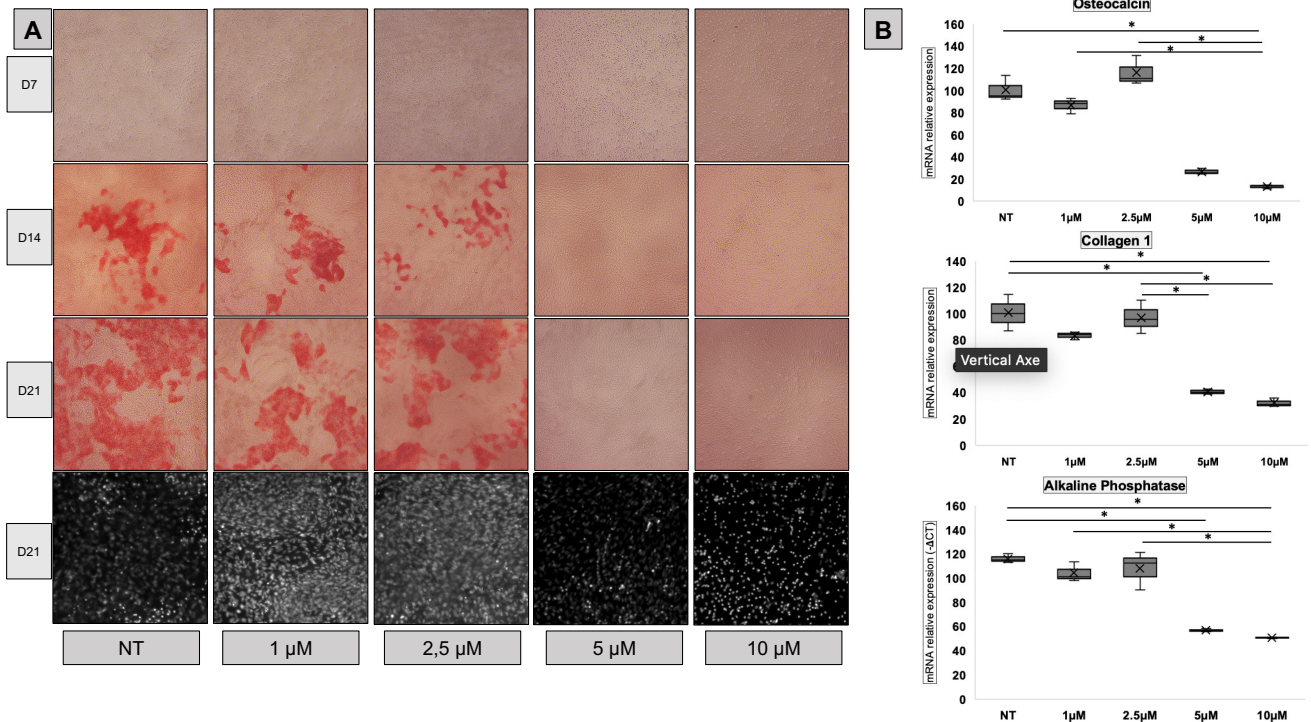


Figure 4: MC3T3 cell culture: (A) semi-quantitative alizarin red staining, indicating mineralization in red. The appearance of mineralization as early as day 14 for iron concentrations between 0 and 2.5 μM . The last line shows the Hoechst stain, marking a decrease in the number of nuclei for iron concentrations greater than or equal to 5 μM . NT= Non treated with Iron, F0 = Concentration of 1 μM , F1 = Concentration of 2,5 μM , F2 = Concentration of 5 μM , F3 = Concentration of 10 μM , (B) The figure shows the determination of the genes of interest (collagen 1, osteocalcin, alkaline phosphatase) in bone metabolism as a function of iron concentration. Decreased expression of genes of interest at iron concentrations greater than or equal to 5 μM . NT: Not treated. * $p < 0,05$.

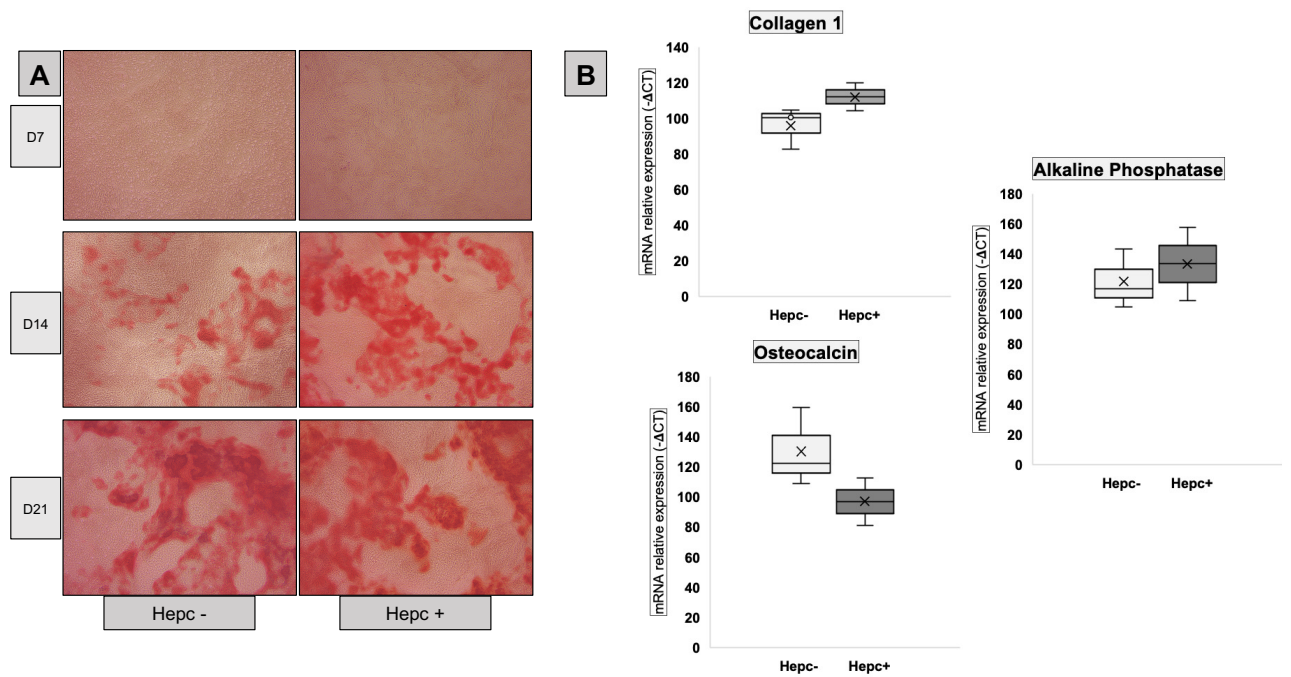


Figure 5: MC3T3 cell culture: (A) semi-quantitative alizarin red staining, indicating mineralization in red. Significant mineralization from day 14. No difference between cultures with or without hepcidin. (B) Same observation for gene expression at D7, no difference between cultures with or without hepcidin.

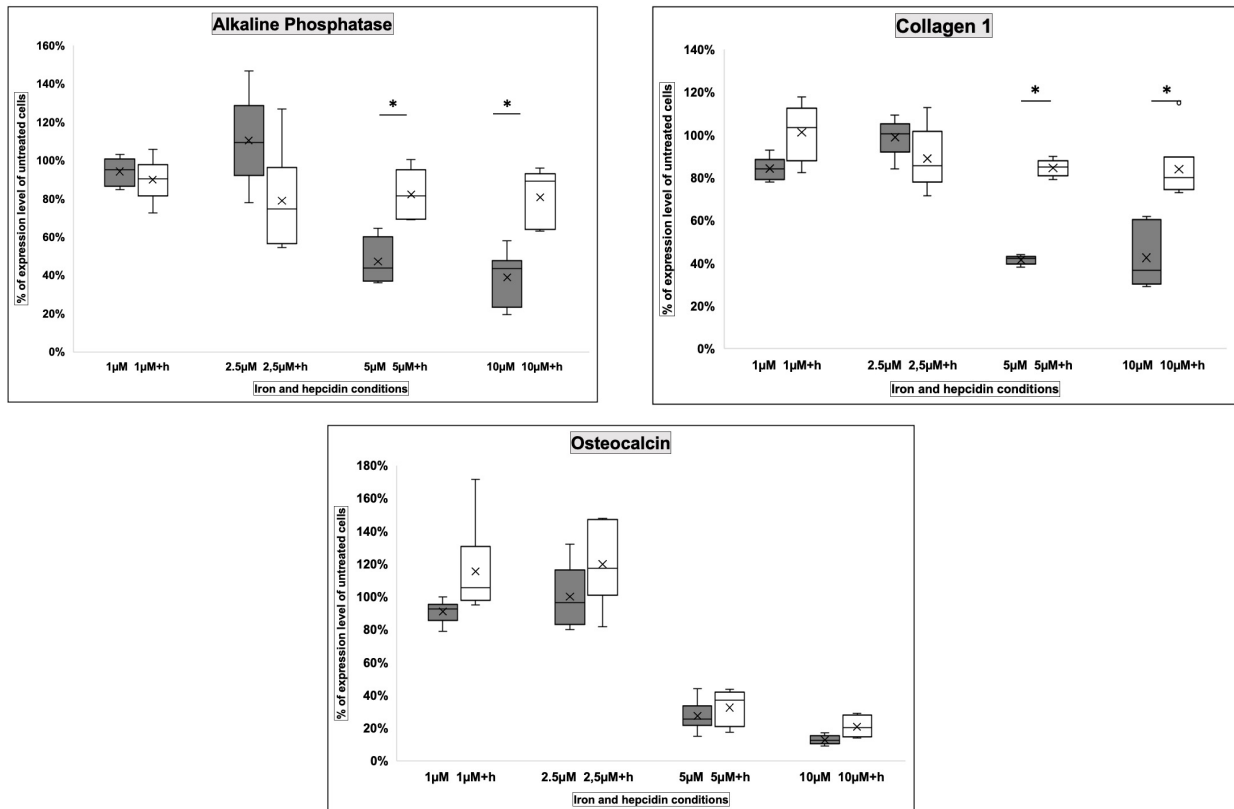


Figure 6: Correction of iron impact by hepcidin treatment. Analyze of the impact of hepcidin on MC3T3 cells treated with iron (1, 2,5, 5 and 10 μ M) during 7 days. The impact of hepcidin treatment was analyzed by comparison between cells treated with iron alone and with iron at the same dose plus hepcidin. A normalization process between experiments (see material and methods) was performed to express, in each experiment, the level of each culture condition as a percentage of the expression in totally untreated cells (100%) of the same experiment. Mann Whitney tests are run to compare the expression of genes of interest (osteocalcin, collagen 1, and Alkaline Phosphatase) with and without the addition of hepcidin (white or grey column respectively). The tests are performed independently for each dose of iron, NT: Not treated. * $p < 0,05$.

Article 2

En préparation

La concentration sérique de métaux dépend du sexe et est associée à la survenue de fractures : résultats de la cohorte METOSTEO

Manuscrit incomplet, en préparation, avec inclusions toujours en cours

Le rôle des métaux dans le développement de l'ostéoporose a souvent été évoqué avec des résultats contradictoires. Le but de cette étude était de déterminer le rôle potentiel de certains métaux dans la survenue de fractures afin d'identifier de potentiels groupes à risque.

Pour cela, nous avons réalisé une étude monocentrique dans le service de rhumatologie du CHU de Rennes avec deux groupes d'étude : un groupe expérimental (OF) présentant une fracture ostéoporotique majeure et un groupe témoin (OD) sans fracture mais avec une densité minérale osseuse pathologique (T-score < -2,5 DS à un site).

Les données cliniques recueillies étaient les données démographiques classiques (sexe, âge, indice de masse corporelle (IMC)), mais aussi les facteurs de risque d'ostéoporose et les facteurs de risque de chute. Les données biologiques comprenaient le bilan biologique standard utilisé dans l'ostéoporose ainsi que la concentration sérique de métaux d'intérêt évaluée par ICP-MS. Enfin, chaque patient a bénéficié de la mesure de sa densité minérale osseuse, sur la même machine (Hologic Horizon W).

Pour le moment, (entre Janvier 2021 et Aout 2022), sur les 200 patients prévus, 172 patients ont été inclus, 116 dans le groupe OF et 56 dans le groupe OD. Nous avons analysé les résultats intermédiaires. La moyenne d'âge était significativement différente entre les groupes (67.1±12.9 pour OD contre 77.6±10,7 pour OF, $p < 0,001$). La proportion de femme était similaire dans les groupes (80% pour OD contre 72% pour OF). Il n'existait pas de différence significative entre les populations concernant les concentrations de calcium, phosphate, 25OH vitamine D et Parathormone. La ferritine était significativement augmentée dans le groupe OF par rapport au groupe OD (171,1±185 contre 282,3±282 ng/ml ($p < 0,01$)). La situation était la même dans la population féminine, mais n'était pas observée chez l'homme. Concernant les autres métaux, chez la femme, le fer sérique et le sélénium étaient significativement diminués dans le groupe OF par rapport au groupe OD ($p < 0,05$ dans les deux cas). Chez

l'homme, le sélénium était là encore diminué dans le groupe OF par rapport au groupe OD ($p < 0,05$), alors que l'aluminium et le cadmium étaient augmentés ($p < 0,05$ dans les deux cas). Chez l'homme, les concentrations de cadmium et d'aluminium étaient positivement corrélées au risque de fracture ($\rho = +0,492$, $p < 0,05$ et $\rho = +0,460$, $p < 0,05$ respectivement). Chez la femme, la ferritine était positivement corrélée au risque de fracture ($\rho = +0,221$, $p < 0,05$). Dans les deux sexes, la concentration sérique de sélénium était négativement corrélée au risque fracturaire ($\rho = -0,199$, $p < 0,05$ chez la femme et $\rho = -0,368$, $p < 0,05$ chez l'homme).

Au total, et dans les limites d'inclusion de patients toujours en cours, L'augmentation de la ferritine chez la femme et du cadmium et de l'aluminium chez l'homme semble associée au risque de fracture. La diminution du sélénium sérique semble être un déterminant du risque de fracture dans les deux sexes. Après complétion des inclusions nous vérifierons que les tendances dégagées se confirment et nous évaluerons si les facteurs recueillis permettent de déterminer le risque de survenue d'une fracture.

Plasma metal concentration is sex dependent and associated with fracture occurrence: results of the METOSTEO cohort.

François Robin (1,2); Martine Ropert (1); Simon Cadiou (2); Marie-Laure Island (1) ; Olivia Berthoud (2); Olivier Loreal* ;Pascal Guggenbuhl*(1,2) (1).

¹Univ Rennes, INSERM, CHU Rennes, UMR 1241, Institut NuMeCan (Nutrition Metabolisms and Cancer), Rennes, France.

²Rheumatology department, Rennes University Hospital, Rennes, France.

1. Introduction

Osteoporosis results in fracture occurrence, by decreasing bone mass and quality(1). This disease, by its high incidence, remains a public health problem. The occurrence of a fragility fracture is associated with a significant increase in mortality(2), but also increases the risk of a potential new fracture in the first year by about 25%(3). The risk of institutionalization in the years following a severe fracture is also significant, representing 10-20% of the patients(4,5). Moreover, 20-60% of all the patients, depending on the study, will require assistance in daily living(4). Thus, the social cost of this disease is extremely high. In France, direct cost of osteoporotic fractures in 2019 represented about 2.6% of health care expenditure(1). Osteoporosis affects both sex, with significant differences, affecting 50% of postmenopausal women (6) and about 20% of men over 50(7). Despite frequent and easy diagnosis and numerous therapeutic alternatives, osteoporosis remains insufficiently identified and treated(8), which has led to the development of organizational structures (Fracture Liaison Service, FLS) to improve patients care(9). The role of these structures is firstly to identify patients who require treatment at an early stage and secondly to promote compliance with treatment. These structures seem to limit the risk of new fracture, and reduce post-fracture mortality(10).

The diagnosis of osteoporosis can be made in two main situations: i) occurrence of a fracture in a low-energy trauma in a typical site (femur, proximal tibia, proximal humerus, pelvis, vertebra) or ii) by identification by dual energy X-ray absorptiometry (DXA) of a pathological bone mineral density ($BMD \leq -2.5$ Standard Deviation (SD))(11). The measurement of bone mineral density (BMD) is very relevant and precious in daily practice as its decrease is highly associated with the risk of fracture(12). However, specific situations can lead to measurement errors, such as osteomalacia or

osteoarthritis(13) and DXA is not relevant in all clinical situations, for instance in the first few months of corticosteroid therapy, DXA is not always decreased(14,15). The identification of others predictive factors of fracture risk appears to be a major public health issue.

In addition to corticosteroid therapy, which remains the most common cause of osteoporosis in young people(14), osteoporosis is associated with a large number of secondary causes(16). Among these causes, the role of some metals has been reported, such as during iron or copper overload in respectively genetic haemochromatosis(17) or Wilson's disease(18) respectively. Apart from these specific situations with huge overload, metals apart from overload situations seem to have an important role in bone metabolism and homeostasis. Thus, women over 45 years of age with ferritin level in the upper quartile of normal values had a higher risk of fracture(19). Aluminum also seems to be linked to a decrease in osteoblastic activity(20), but its role in the development of osteoporosis remains debated(21). The level of selenium correlated positively with bone health, as it increased bone mineral density or reduced the risk of osteoporotic fracture(22). Outside of pathological situations, metals is also integrated into the structure of bone, notably through the substitution of calcium within hydroxyapatite(23,24), crystal representing about 60% of total bone mass(25). This substitution results in the modification of the physical and chemical properties of the crystal. This ability is the base of the creation of synthetic hydroxyapatite based biomaterials, used notably in orthopedic implants, or in the repair of bone defects(23,26). Apart from bone pathology, the role of metals has already been mentioned in health and diseases. In dementia for example, arsenic or selenium exposure seem to induce an additional risk(27). There also appears to be a positive association between plasma copper, molybdenum and vanadium concentrations and cardiovascular diseases related mortality(28).

The aim of this study was to evaluate the consequences of variations in plasma metal concentrations on fracture risk and to clarify their role in the development of osteoporosis. Since the major consequence of osteoporosis is fracture, the main objective of the study was to investigate possible predictive factors for fracture occurrence related to serum metal concentration and thus identify groups of patients with a higher potential risk of fracture.

2. Materials and methods

a. Population

We performed a monocentric study conducted in the rheumatology department of the University Hospital of Rennes, France. We used two study groups: experimental group (OF) with a severe osteoporotic fracture event (major fracture: proximal tibia, femur, vertebra, pelvis, proximal humerus) and control group (OD) without fracture but with osteoporosis in DXA ($BMD \leq -2.5$ SD). The recruitment of the fracture group was conducted through the fracture liaison service, in which patients were included after fracture occurrence. The recruitment of the group of patients without fracture with pathological BMD was carried out just after their evaluation by DXA, after the confirmation of the absence of major fracture history. The exclusion criteria were patient opposition, adults under legal protection (legal protection, curatorship, guardianship), persons deprived of their liberty, pregnant or breastfeeding women, minors, persons unable to express their opposition.

Before inclusion, all patients were informed of the objectives and procedure of the study and gave their consent. The study was approved by the ethics committee of Rennes university hospital (notice n° 20.154, December 2020).

b. Data collected

i. Clinical data

We used a standardized questionnaire to collect standard demographic data (sex, weight, height, age at inclusion, Body Mass Index (BMI)), but also risk factors for osteoporosis (personal history of severe or non-severe fractures, first-degree family history of severe fracture, menopausal status, smoking or alcohol consumption, corticosteroid therapy, secondary causes of osteoporosis, personal history of anti-osteoporotic treatment) and risk factors for fall (personal history of a fall in the past year, polymedication, history of dementia, Parkinson's disease, depression, urinary incontinence, walking disorders, reduced visual acuity, malnutrition, presence of a technical walking assistance).

ii. Biological data

We performed biological tests: serum calcium, phosphorus, magnesium, creatinine, C-reactive protein (CRP) levels were measured, Thyroid-Stimulating

hormone (TSH), 25 OH vitamin D and parathyroid hormone (PTH), liver function tests (Alanin amino-transferase (AST), Aspartate amino-transferase (ALT), gamma-GT, Alkaline phosphatase) levels were determined. Blood cells count, electrophoresis of plasma protein, ferritin level, albumine levels were determined. At the same time and on the same sample tube, the plasma concentration of metals was evaluated by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS) on a X-Series II from Thermo Scientific® (Platform AEM2, University of Rennes 1/Biochemistry Laboratory, University Rennes Hospital), technique allowing the parallel assessment of the concentrations of a large number of metals and the establishment of metallomic profiles(29). The metals analyzed were iron (^{56}Fe), copper (^{63}Cu), zinc (^{66}Zn), selenium (^{78}Se), molybdenum (^{96}Mo), manganese (^{55}Mn), cobalt (^{59}Co), cadmium (^{106}Cd), and aluminum (^{27}Al). The results were expressed in micrograms per liter ($\mu\text{g/l}$) and micromoles per liter ($\mu\text{mol/l}$). The determination of hepcidin level in plasma was also performed, with results expressed in nanomoles per litre (nmol/l).

iii. DXA evaluation

BMD measurement was performed by DXA for all patients on the same machine (Hologic Horizon W (Hologic, Waltham, MA, USA)) within the University Hospital of Rennes. Results were expressed in g/cm^2 with T-Score (expressed in SD). Trabecular Bone Score (TBS) was also measured. Vertebral Fracture Assessment (VFA) was performed at the same time to ensure that there was no asymptomatic vertebral fracture.

c. Statistical analysis

All analyses were performed using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) 28.0 software. Chi-squared test was used to compare percentages. Groups were initially compared using non-parametric Kruskal-Wallis ANOVA, followed, when appropriate, by a comparison group by group using Mann-Whitney's test. Correlation analyses were performed using Spearman's test. A p value <0.05 was considered significant.

Résultats

From the 176 patients that have been already included, the results are as follow.

To date, 176 patients, from the 200 patients targeted, have been included, 116 in the OF group and 56 in the OD group. The mean age was significantly different between the groups (67.1 ± 12.9 for OD versus 77.6 ± 10.7 year for OF, $p < 0.001$). The proportion of women was not significantly different between the groups (80% for OD versus 72% for OF). There was no significant difference between the two groups regarding the concentrations of calcium, phosphate, 25OH vitamin D and Parathormone.

Plasma metal concentrations for each group regarding sex are presented in table 1, figure 1 and 2.

| Metal Group | Iron ($\mu\text{g/l}$) | Aluminum ($\mu\text{g/l}$) | Selenium ($\mu\text{g/l}$) | Cadmium ($\mu\text{g/l}$) | Manganese ($\mu\text{g/l}$) | Zinc ($\mu\text{g/l}$) | Copper ($\mu\text{g/l}$) |
|------------------------------|-----------------------------|---------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|----------------------------------|-----------------------------|-------------------------------|
| Men OD | 1365 \pm 573 | 1,12 \pm 0,47 | 105 \pm 19 | 0,004 \pm 0,004 | 0,57 \pm 0,21 | 797 \pm 133 | 1125 \pm 375 |
| Men OF | 955 \pm 381 | 1,76 \pm 0,73 | 90 \pm 28 | 0,017 \pm 0,013 | 0,56 \pm 0,19 | 755 \pm 111 | 1191 \pm 216 |
| Women OD | 1139 \pm 442 | 1,7 \pm 0,8 | 105 \pm 31 | 0,016 \pm 0,01 | 0,56 \pm 0,14 | 780 \pm 178 | 1290 \pm 278 |
| Women OF | 1023 \pm 433 | 1,7 \pm 0,7 | 92 \pm 20 | 0,020 \pm 0,01 | 0,51 \pm 0,12 | 766 \pm 118 | 1312 \pm 209 |

Table 1: Plasma concentration of metals of interest, expressed in $\mu\text{g/l}$, OD: Densitometric Osteoporosis, OF, Osteoporosis with Fracture.

The ferritin level was significantly increased in the OF group compared to the OD group (171.1 ± 185 versus 282.3 ± 282 ng/ml ($p < 0.01$)). This was especially true in the female population (**Figure 1**), but was not observed in men. Importantly, in women, the ferritin level was positively correlated with fracture risk ($\rho = +0.221$, $p < 0.05$). In women the selenium level was decrease in OF group compared to OD group.

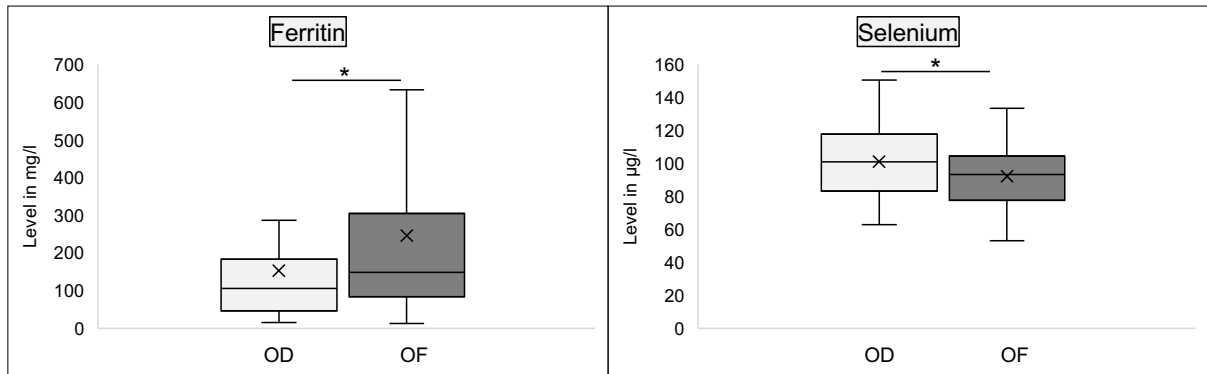


Figure 1: Significant data for women. * $p < 0,05$. OD: Densitometric Osteoporosis, OF, Osteoporosis with Fracture.

In men, aluminum and cadmium concentrations in plasma were increased (both $p < 0.05$) in the OF group compared to the OD group (figure 2) and positively correlated with fracture risk ($\rho = +0.492$, $p < 0.05$ and $\rho = +0.460$, $p < 0.05$ respectively). This was not true in women.

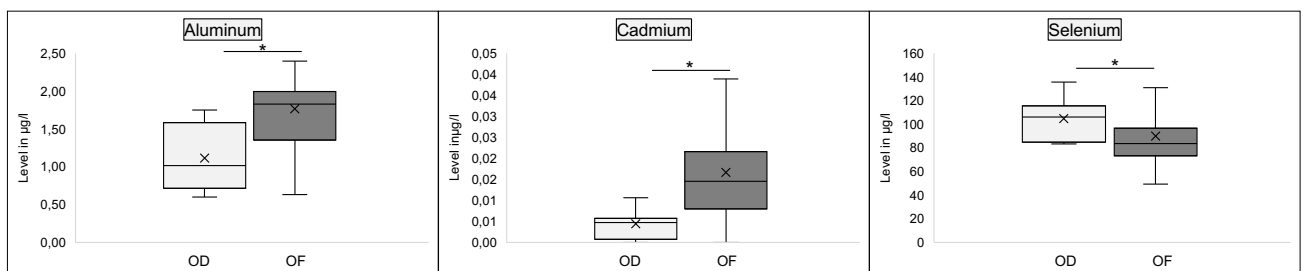


Figure 2: Significant data for men. * $p < 0,05$. OD: Densitometric Osteoporosis, OF, Osteoporosis with Fracture.

Thus, our intermediate data suggests a difference in plasma metal concentrations with notable differences between men and women and potentially different risk groups. After completion of the enrollment, those data will be reanalyzed and their potential interest as predictive factor will be analyzed.

The discussion of the intermediate data has been integrated in the general discussion.

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

L'objectif principal de ce travail était de progresser dans la compréhension des mécanismes en cause dans le développement de l'ostéoporose liée aux surcharges en fer. Étant donné que, en dehors des situations caricaturales de surcharge en fer comme les hémochromatoses, les femmes ménopausées ayant une ferritine dans le quartile supérieur de la normale présentaient un risque de fracture plus important(6), les mécanismes identifiés dans le cadre de ce travail pourraient aussi s'appliquer à une population plus large.

I) L'impact du fer lui-même est-il lié à sa localisation plus qu'à sa concentration ?

Le fer, métal indispensable à un grand nombre de réactions enzymatiques dans l'organisme(104), doit être finement régulé, afin d'éviter des situations de carence ou de surcharge. Dans ces situations de déséquilibre, le fer peut induire une toxicité tissulaire, notamment par la production de ROS(191). Cette notion a d'abord fait envisager un rôle toxique direct du fer sur le tissu osseux dans le développement de l'ostéoporose liée aux surcharges en fer. Notre travail suggère que la concentration osseuse en fer n'est pas le facteur principal pour expliquer la perte osseuse. Dans l'étude des modèles murins de surcharges en fer génétique et secondaire, la concentration osseuse en fer était beaucoup plus importante dans le modèle de surcharge secondaire (3 fois supérieure au modèle *Hfe*^{-/-} et similaire au modèle *Bmp6*^{-/-}), mais n'était pas associée à une perte osseuse, alors que c'était le cas dans les modèles de surcharge génétique.

Il est assez bien identifié que dans le cadre des surcharges en fer, la répartition du fer dans l'organisme est variable en fonction de l'étiologie sous-jacente et de la place de l'axe ferroportine-hepcidine dans la genèse de la pathologie et dans la réponse au désordre du métabolisme du fer. L'hepcidine, produite au niveau des hépatocytes, inhibe l'expression et l'activité biologique du principal exportateur du fer des cellules, la ferroportine(101,102,104). Les situations de surcharge en fer secondaire systémique (maladies hématologiques, transfusion) entraînent physiologiquement une augmentation de l'hepcidine, et le fer est d'abord classiquement localisé dans les macrophages (101). A l'inverse, les surcharges génétiques, telles que

l'hémochromatose génétique, sont associées à une hepcidino-déficience(123), qui entraîne une surcharge en fer parenchymateuse du fait de l'apparition de FNLT. Ainsi, au sein des organes cibles, la répartition cellulaire des dépôts de fer peut elle aussi varier en fonction de la cause de la surcharge en fer. Au niveau du foie, par exemple, la répartition du fer, ainsi que l'expression locale d'hepcidine diffère en cas de surcharge génétique (souris *Hfe^{-/-}*) ou de surcharge secondaire à une hyperhepcidinémie (inflammation induite par injection péritonéale de lipopolysaccharides)(192). A un stade précoce de l'hémochromatose génétique, le dépôt de fer se localise principalement dans les hépatocytes au niveau de la région péri-portale puis s'étend progressivement vers la région centro-lobulaire(192,193). La répartition du fer dans le foie en cas de surcharge en fer secondaire touche d'abord les macrophages et semble elle plus ubiquitaire dans le lobule hépatique(192).

Dans les modèles murins utilisés dans notre travail, la topographie de la répartition du fer au sein du tissu osseux diffère également entre la surcharge en fer génétique et secondaire (**Figure 8**). Dans la surcharge en fer secondaire à l'injection de fer dextran, les dépôts de fer semblent principalement situés dans les macrophages de la moelle osseuse, sans dépôts significatifs de fer au niveau des travées osseuses. A l'inverse, dans les deux modèles de surcharge en fer génétique (*Hfe^{-/-}* et *Bmp6^{-/-}*), comme précédemment décrit(159,161), les dépôts de fer semblent significativement localisés au sein des travées osseuses, ainsi qu'au sein de quelques macrophages de la moelle osseuse. De façon intéressante, cette répartition linéaire des dépôts de fer le long des travées osseuses a aussi été décrit dans la littérature dans un autre modèle murin de surcharge en fer génétique de déficit en hepcidine (*Hepc1^{-/-}*)(185).

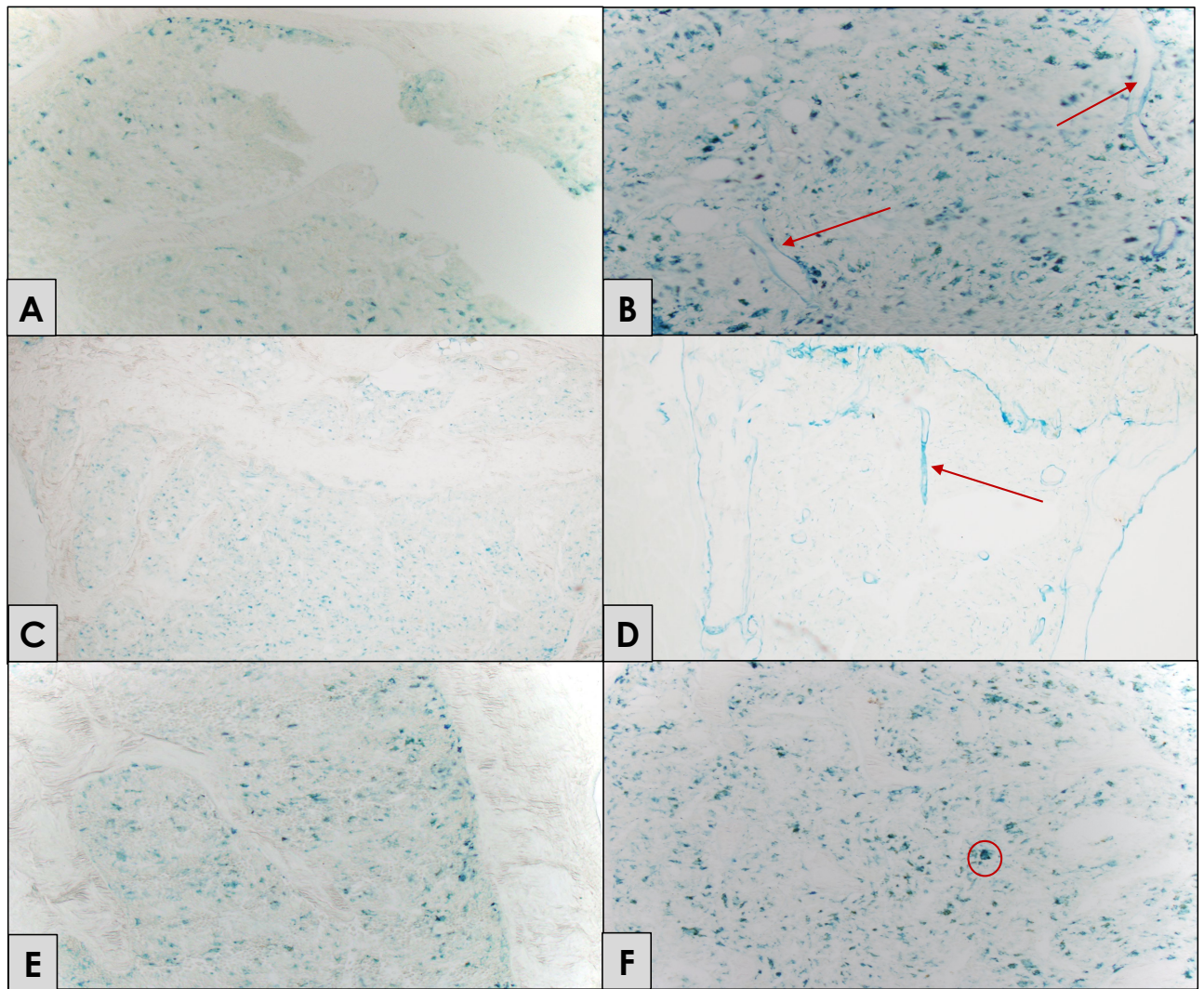


Figure 8 : Coloration de Perls de la région proximale des tibias de souris. Dépôts le long des travées osseuses (flèche rouge) dans le contexte de surcharge génétique (*Hfe*^{-/-} et *Bmp6*^{-/-}). Dépôts plutôt intracellulaires (cercle rouge) dans le modèle de surcharge secondaire. A : témoin sauvage âgé de 12 mois, B : souris *Hfe*^{-/-} âgées de 12 mois, C : souris sauvage âgées de 6 mois, D : souris *Bmp6*^{-/-} âgées de 6 mois, E : souris âgées de 6 mois traitées solution saline, F : souris âgées de 6 mois traitées au fer-dextran.

II) L'hepcidino-déficience est-elle l'acteur principal de la perte osseuse liée aux surcharges en fer ?

Comme décrit précédemment (**Figure 6**), l'hepcidine a comme rôle physiologique principal de limiter l'action biologique et l'expression du principal exportateur du fer qu'est la ferroportine(101,102,104). En situation physiologique, en cas d'augmentation du fer, l'hepcidine augmente afin de limiter l'augmentation du fer plasmatique. Dans le cadre des hémochromatoses génétiques, il existe une hepcidino-déficience ou plus rarement une hepcidino-résistance, qui caractérise ces maladies(123).

Dans notre travail, les modèles murins de surcharge en fer utilisés sont en accord avec ce profil biologique, avec une hyperhepcidinémie dans le modèle de surcharge secondaire à l'injection de fer dextran, et une inadéquation du taux d'hepcidine vis-à-vis de la surcharge en fer systémique dans les modèles de surcharge en fer génétique (*Hfe*^{-/-} et *Bmp6*^{-/-}). Comme décrit précédemment, la perte osseuse n'était significative que dans le cas de surcharge en fer génétique, interrogeant sur le rôle potentiel de la diminution de l'hepcidine dans le développement de la perte osseuse.

Le lien entre l'hepcidine et la survenue d'anomalies osseuses a déjà été étudié, l'inactivation du gène *Hamp* chez la souris aboutissant à des anomalies de la microarchitecture osseuse plutôt évocatrices d'un phénotype de dépression ostéoblastique avec diminution du BV/TV marqué surtout par la diminution du Tb.Th (185). Dans notre travail, les anomalies de la microarchitecture osseuse observées dans le cadre des surcharges en fer génétiques sont, elles-aussi, évocatrice d'une dépression ostéoblastique (diminution du Tb.Th). Dans le cas du modèle *Bmp6*^{-/-}, ces anomalies osseuses sont corrélées à l'expression hépatique d'hepcidine.

Nous avons aussi évalué les conséquences de la surcharge en fer et de l'hepcidine *in vitro*, sur des précurseurs ostéoblastiques (modèle murin MC3T3, sous-clone 4). Nos travaux ont mis en évidence que la capacité de minéralisation de ces précurseurs ostéoblastiques était inhibée par l'ajout de fer (Fer Ammonium Citrate) à partir d'une concentration de 5 µM. L'ajout d'hepcidine semble pouvoir contrecarrer les effets du fer lorsqu'il est présent en limitant la diminution des niveaux d'ARNm observée après exposition au fer du principal composant de la matrice osseuse, le collagène 1, et des marqueurs de la formation osseuse tels que la phosphatase alcaline (Figure 9). A noter

que l'hepcidine seule, sans adjonction concomitante de fer était sans impact, en condition basale, sur l'expression les niveaux d'expression des ARNm exprimés dans les ostéoblastes.

Cette observation avait déjà été faite dans un modèle *in vivo* de zebrafish, avec rétablissement des taux de Runx2 et d'ostéocalcine par ajout d'hepcidine en présence de fer, sans conséquence de l'ajout d'hepcidine à l'état basal. Dans ce modèle, l'hepcidine permettait de diminuer les ROS(183). La diminution des ROS semblerait plutôt en lien avec l'action de l'hepcidine sur la modulation du fer, diminuant sa concentration ce qui aurait deux conséquences sur la fonction des ostéoclastes : une diminution du contenu intracellulaire en fer des ostéoclastes mais aussi une diminution de la production des ROS, qui diminue le taux de PGC1- β et la biogénèse mitochondriale, décrite comme promouvant l'action des ostéoclastes(171,187).

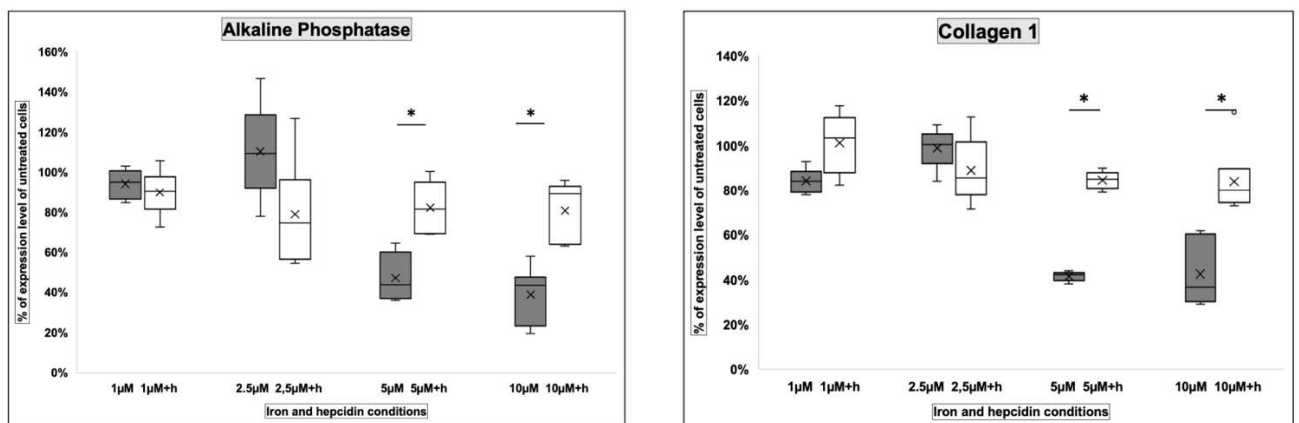


Figure 9 : Culture cellulaire MC3T3 : Expression des gènes d'intérêt dans les cultures cellulaires traitées avec du fer à des doses croissantes, avec ou sans l'ajout d'hepcidine (colonne blanche ou grise respectivement). Les résultats sont exprimés en pourcentage du contrôle (100%). * $p < 0,05$.

Nous avons aussi entrepris de doser l'hepcidine chez les patients atteints d'ostéoporose au sein des groupes d'études décrits précédemment, entre ostéoporose fracturaire ou densitométrique. Les résultats sont en cours.

III) Le rôle des autres métaux dans l'ostéoporose

Nos résultats de l'analyse intermédiaire de notre étude clinique suggèrent que le métabolisme d'autres métaux pourrait être perturbés en situation d'ostéoporose.

1) Au cours des surcharges en fer

Au cours des surcharges en fer, cette constatation pourrait avoir une place. En effet, le métabolisme du fer présente de nombreuses interrelations avec le métabolisme des autres métaux(104). Pour prendre l'exemple de l'hepcidine notamment, son expression est augmentée par le cobalt, le zinc, le cuivre ou le cadmium(156). De plus, les métaux sont connus pour interagir avec le métabolisme osseux à des degrés divers, notamment l'aluminium(76), le cuivre(73,78), le zinc(78), le manganèse(77) et souvent avec des résultats contradictoires.

Pour l'aluminium, son rôle a surtout été étudié il y a quelques années, lors de la mise en évidence de contamination des liquides de dialyse responsables, au niveau osseux, de troubles de la minéralisation de type ostéomalacie(194). Nous allons préciser les relations suggérées par nos résultats cliniques en étudiant les métaux dans le tissu osseux. Par ailleurs, les dépôts de fer étant localisés de façon spécifique dans la matrice osseuse au cours de l'hepcidino-déficience, nous nous attacherons à rechercher par des colorations spécifiques (par exemple le Solochrome azurine B pour l'aluminium et par laser ablation ICPMS, qui permet de faire des cartographies osseuses des métaux) si des modifications de leur répartition existent dans le tissu osseux. Il faut signaler qu'une équipe a rapporté une colocalisation de l'aluminium et du fer au niveau osseux, notamment dans le cadre de l'hémochromatose ou de la drépanocytose(195).

2) Dans l'ostéoporose fracturaire et densitométrie

Chez l'homme, l'aluminium et le cadmium étaient augmentés dans le groupe OF par rapport au groupe OD et positivement corrélées au risque de fracture. Ce résultat n'était pas observé chez la femme. L'impact de l'aluminium dans l'os a déjà été souvent évalué, principalement il y a plusieurs années chez les patients dialysés avec des résultats souvent contradictoires(196,197), mais c'est à notre connaissance la

première fois que le rôle de ce métal est mis en évidence chez l'homme précisément. Pour le cadmium, l'intérêt pour son impact sur le métabolisme est plus récent. Il provient principalement de l'activité humaine, notamment de l'agriculture et de l'industrie. Sa demi-vie dans l'organisme est longue (10 à 30 ans) avec risque de toxicité à long terme(75). Le cadmium semblerait diminuer la formation osseuse, par activation de l'apoptose des ostéoblastes et augmenter la résorption osseuse en stimulant la différenciation des ostéoclastes(75,198).

Dans les deux sexes, la diminution du sélénium sérique semble être un déterminant du risque de fracture dans les deux sexes. Dans notre population, la concentration sérique de sélénium était négativement corrélée au risque fracturaire. Cette notion avait déjà été évoquée(199,200), là encore avec des résultats contradictoires, rapportant soit une association positive avec la qualité osseuse ou l'absence d'effet. Mais les résultats sont difficiles à interpréter, notamment parce que les concentrations de sélénium sont fortement corrélées à l'état nutritionnel(201), à la qualité du tissu musculaire(202–204), tous deux potentiellement en lien avec le risque de chute. De plus, la concentration de sélénium a tendance à diminuer avec l'âge(201,205), et dans notre étude, la population ayant présenté des fractures était significativement plus âgée que la population contrôle.

Cette cohorte semble donc évoquer une différence de la concentration sérique des métaux entre les sexes avec des différences notables entre homme et femme et potentiellement des groupes à risque différents.

Conclusions et Perspectives

Ce travail avait comme objectif de préciser les mécanismes sous-tendant le développement de la perte osseuse dans le cadre des surcharges en fer. L'intérêt pour cette cause secondaire de perte osseuse est renforcé par le fait que l'augmentation de la ferritinémie chez les femmes ménopausées suggèrent que des anomalies du métabolisme du fer pourraient participer à l'ostéoporose post-ménopausique.

Les mécanismes évoqués sont multiples. Pour autant, le fer lui-même ne semble pas expliquer à lui-seul la perte osseuse. Dans notre travail, l'hepcidine semble être un élément potentiellement important de la perte osseuse dans les situations d'hepcidino-déficience. Cette constatation sera à prendre en compte dans les futures études sur l'effet des saignées thérapeutiques sur le patrimoine osseux de patients ostéoporotiques. Enfin les liens entre ostéoporose et certains métaux suggérés par nos résultats intermédiaires doivent être précisés par la complétion de notre étude clinique, et l'analyse de ces métaux dans les tissus osseux dans nos modèles murins et la caractérisation de certaines situations cliniques rares (notamment lors de l'intoxication à certains métaux).

BIBLIOGRAPHIE

1. Willers C, Norton N, Harvey NC, Jacobson T, Johansson H, Lorentzon M, et al. Osteoporosis in Europe: a compendium of country-specific reports. *Arch Osteoporos*. déc 2022;17(1):23.
2. Briot K, Roux C, Thomas T, Blain H, Buchon D, Chapurlat R, et al. 2018 update of French recommendations on the management of postmenopausal osteoporosis. *Joint Bone Spine*. oct 2018;85(5):519-30.
3. Bouvard B, Briot K, Legrand E, Blain H, Breuil V, Chapurlat R, et al. Recommandations françaises de la prise en charge et du traitement de l'ostéoporose masculine. *Revue du Rhumatisme*. mai 2021;88(3):173-82.
4. Guggenbuhl P, Brissot P, Loréal O. Miscellaneous non-inflammatory musculoskeletal conditions. *Haemochromatosis: the bone and the joint*. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2011;25(5):649-64.
5. Piriyaakuntorn P, Tantiworawit A, Phimphilai M, Shinlapawittayatorn K, Chattipakorn SC, Chattipakorn N. Impact of iron overload on bone remodeling in thalassemia. *Arch Osteoporos*. déc 2020;15(1):143.
6. Kim BJ, Lee SH, Koh JM, Kim GS. The association between higher serum ferritin level and lower bone mineral density is prominent in women ≥ 45 years of age (KNHANES 2008-2010). *Osteoporos Int*. oct 2013;24(10):2627-37.
7. Rodan GA. Introduction to bone biology. *Bone*. 1992;13:S3-6.
8. Morrison SJ, Scadden DT. The bone marrow niche for haematopoietic stem cells. *Nature*. janv 2014;505(7483):327-34.
9. Teti A. Bone Development: Overview of Bone Cells and Signaling. *Curr Osteoporos Rep*. déc 2011;9(4):264-73.
10. McNamara LM. Bone as a Material. In: *Comprehensive Biomaterials II* [Internet]. Elsevier; 2017 [cité 22 févr 2022]. p. 202-27. Disponible sur: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128035818101274>
11. Ascenzi MG. The osteon: the micromechanical unit of compact bone. *Front Biosci*. 2012;17(1):1551.
12. Clarke B. Normal Bone Anatomy and Physiology. *CJASN*. nov 2008;3(Supplement 3):S131-9.
13. Osterhoff G, Morgan EF, Shefelbine SJ, Karim L, McNamara LM, Augat P. Bone mechanical properties and changes with osteoporosis. *Injury*. juin 2016;47:S11-20.

14. Garnero P. The Role of Collagen Organization on the Properties of Bone. *Calcif Tissue Int.* sept 2015;97(3):229-40.
15. Bilezikian JP, Bouillon R, Clemens T, Compston J, Bauer DC, Ebeling PR, et al., éditeurs. *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism* [Internet]. 1^{re} éd. Wiley; 2018 [cité 15 juin 2022]. Disponible sur: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/book/10.1002/9781119266594>
16. Komori T. Functions of Osteocalcin in Bone, Pancreas, Testis, and Muscle. *IJMS.* 12 oct 2020;21(20):7513.
17. Alford AI, Kozloff KM, Hankenson KD. Extracellular matrix networks in bone remodeling. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology.* août 2015;65:20-31.
18. Ponzetti M, Rucci N. Osteoblast Differentiation and Signaling: Established Concepts and Emerging Topics. *IJMS.* 22 juin 2021;22(13):6651.
19. Mao B, Wu W, Davidson G, Marhold J, Li M, Mechler BM, et al. Kremen proteins are Dickkopf receptors that regulate Wnt/beta-catenin signalling. *Nature.* 6 juin 2002;417(6889):664-7.
20. Nusse R, Clevers H. Wnt/ β -Catenin Signaling, Disease, and Emerging Therapeutic Modalities. *Cell.* 1 juin 2017;169(6):985-99.
21. Tanaka S, Matsumoto T. Sclerostin: from bench to bedside. *J Bone Miner Metab.* mai 2021;39(3):332-40.
22. Komori T. Regulation of Proliferation, Differentiation and Functions of Osteoblasts by Runx2. *IJMS.* 4 avr 2019;20(7):1694.
23. Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, Zhang Z, Deng JM, Behringer RR, et al. The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell.* 11 janv 2002;108(1):17-29.
24. Samee N, Geoffroy V, Marty C, Schiltz C, Vieux-Rochas M, Levi G, et al. Dlx5, a Positive Regulator of Osteoblastogenesis, is Essential for Osteoblast-Osteoclast Coupling. *The American Journal of Pathology.* sept 2008;173(3):773-80.
25. Komori T. Regulation of bone development and maintenance by Runx2. *Front Biosci.* 1 janv 2008;13:898-903.
26. Bonewald LF. The amazing osteocyte. *J Bone Miner Res.* févr 2011;26(2):229-38.
27. Dallas SL, Prideaux M, Bonewald LF. The Osteocyte: An Endocrine Cell ... and

More. *Endocrine Reviews*. 1 oct 2013;34(5):658-90.

28. Malone AMD, Anderson CT, Tummala P, Kwon RY, Johnston TR, Stearns T, et al. Primary cilia mediate mechanosensing in bone cells by a calcium-independent mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 14 août 2007;104(33):13325-30.

29. Noble BS. The osteocyte lineage. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. mai 2008;473(2):106-11.

30. Weivoda MM, Youssef SJ, Oursler MJ. Sclerostin expression and functions beyond the osteocyte. *Bone*. mars 2017;96:45-50.

31. Edmonston D, Wolf M. FGF23 at the crossroads of phosphate, iron economy and erythropoiesis. *Nat Rev Nephrol*. janv 2020;16(1):7-19.

32. Imel EA, Biggin A, Schindeler A, Munns CF. FGF23, Hypophosphatemia, and Emerging Treatments. *JBMR Plus* [Internet]. août 2019 [cité 24 févr 2022];3(8). Disponible sur: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jbm4.10190>

33. Ho BB, Bergwitz C. FGF23 signalling and physiology. *Journal of Molecular Endocrinology*. févr 2021;66(2):R23-32.

34. Kinoshita Y, Fukumoto S. X-Linked Hypophosphatemia and FGF23-Related Hypophosphatemic Diseases: Prospect for New Treatment. *Endocrine Reviews*. 1 juin 2018;39(3):274-91.

35. Czaya B, Faul C. The Role of Fibroblast Growth Factor 23 in Inflammation and Anemia. *IJMS*. 27 août 2019;20(17):4195.

36. Schaefer B, Tobiasch M, Wagner S, Glodny B, Tilg H, Wolf M, et al. Hypophosphatemia after intravenous iron therapy: Comprehensive review of clinical findings and recommendations for management. *Bone*. janv 2022;154:116202.

37. Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature*. mai 2003;423(6937):337-42.

38. Miyauchi A, Alvarez J, Greenfield EM, Teti A, Grano M, Colucci S, et al. Binding of osteopontin to the osteoclast integrin $\alpha\beta3$. *Osteoporosis Int*. janv 1993;3(S1):132-5.

39. Soysa NS, Alles N. Osteoclast function and bone-resorbing activity: An overview. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. juill 2016;476(3):115-20.

40. Eriksen EF. Cellular mechanisms of bone remodeling. *Rev Endocr Metab Disord*. déc 2010;11(4):219-27.

41. Eriksen EF. Normal and Pathological Remodeling of Human Trabecular Bone:

Three Dimensional Reconstruction of the Remodeling Sequence in Normals and in Metabolic Bone Disease*. *Endocrine Reviews*. nov 1986;7(4):379-408.

42. Matsuo K, Irie N. Osteoclast–osteoblast communication. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. mai 2008;473(2):201-9.

43. Seeman E. Bone quality: the material and structural basis of bone strength. *J Bone Miner Metab*. janv 2008;26(1):1-8.

44. Raggatt LJ, Partridge NC. Cellular and Molecular Mechanisms of Bone Remodeling. *Journal of Biological Chemistry*. août 2010;285(33):25103-8.

45. Ma YL, Cain RL, Halladay DL, Yang X, Zeng Q, Miles RR, et al. Catabolic Effects of Continuous Human PTH (1–38) in Vivo Is Associated with Sustained Stimulation of RANKL and Inhibition of Osteoprotegerin and Gene-Associated Bone Formation. *Endocrinology*. 1 sept 2001;142(9):4047-54.

46. Insogna KL, Sahni M, Grey AB, Tanaka S, Horne WC, Neff L, et al. Colony-stimulating factor-1 induces cytoskeletal reorganization and c-src-dependent tyrosine phosphorylation of selected cellular proteins in rodent osteoclasts. *J Clin Invest*. 15 nov 1997;100(10):2476-85.

47. Sims NA, Martin TJ. Coupling the activities of bone formation and resorption: a multitude of signals within the basic multicellular unit. *BoneKEy Reports [Internet]*. 8 janv 2014 [cité 26 févr 2022];3. Disponible sur: <http://www.portico.org/Portico/article?article=pgk2ph97srv>

48. Crane JL, Zhao L, Frye JS, Xian L, Qiu T, Cao X. IGF-1 Signaling is Essential for Differentiation of Mesenchymal Stem Cells for Peak Bone Mass. *Bone Res*. 28 juin 2013;1(2):186-94.

49. Lowery JW, Pazin D, Intini G, Kokabu S, Chappuis V, Capelo LP, et al. The Role of BMP2 Signaling in the Skeleton. *Crit Rev Eukar Gene Expr*. 2011;21(2):177-85.

50. Sims NA, Martin TJ. Coupling Signals between the Osteoclast and Osteoblast: How are Messages Transmitted between These Temporary Visitors to the Bone Surface? *Front Endocrinol [Internet]*. 24 mars 2015 [cité 28 févr 2022];6. Disponible sur: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fendo.2015.00041/abstract>

51. Juárez P, Guise TA. TGF- β in cancer and bone: Implications for treatment of bone metastases. *Bone*. janv 2011;48(1):23-9.

52. Xie H, Cui Z, Wang L, Xia Z, Hu Y, Xian L, et al. PDGF-BB secreted by preosteoclasts induces angiogenesis during coupling with osteogenesis. *Nat Med*. nov

2014;20(11):1270-8.

53. Karsdal MA, Martin TJ, Bollerslev J, Christiansen C, Henriksen K. Are Nonresorbing Osteoclasts Sources of Bone Anabolic Activity? *J Bone Miner Res.* 16 janv 2007;22(4):487-94.

54. Ota K, Quint P, Ruan M, Pederson L, Westendorf JJ, Khosla S, et al. TGF- β Induces Wnt10b in Osteoclasts From Female Mice to Enhance Coupling to Osteoblasts. *Endocrinology.* 1 oct 2013;154(10):3745-52.

55. Walker EC, McGregor NE, Poulton IJ, Pompolo S, Allan EH, Quinn JM, et al. Cardiotrophin-1 Is an Osteoclast-Derived Stimulus of Bone Formation Required for Normal Bone Remodeling. *Journal of Bone and Mineral Research.* déc 2008;23(12):2025-32.

56. Ishii M, Egen JG, Klauschen F, Meier-Schellersheim M, Saeki Y, Vacher J, et al. Sphingosine-1-phosphate mobilizes osteoclast precursors and regulates bone homeostasis. *Nature.* 26 mars 2009;458(7237):524-8.

57. Kimura H, Kwan KM, Zhang Z, Deng JM, Darnay BG, Behringer RR, et al. Cthrc1 Is a Positive Regulator of Osteoblastic Bone Formation. *Rutherford S, éditeur. PLoS ONE.* 9 sept 2008;3(9):e3174.

58. Takeshita S, Fumoto T, Matsuoka K, Park K ae, Aburatani H, Kato S, et al. Osteoclast-secreted CTHRC1 in the coupling of bone resorption to formation. *J Clin Invest.* 3 sept 2013;123(9):3914-24.

59. Matsuoka K, Park K ae, Ito M, Ikeda K, Takeshita S. Osteoclast-Derived Complement Component 3a Stimulates Osteoblast Differentiation: C3a as a coupling factor. *J Bone Miner Res.* juill 2014;29(7):1522-30.

60. Weivoda MM, Chew CK, Monroe DG, Farr JN, Atkinson EJ, Geske JR, et al. Identification of osteoclast-osteoblast coupling factors in humans reveals links between bone and energy metabolism. *Nat Commun.* déc 2020;11(1):87.

61. Zhao C, Irie N, Takada Y, Shimoda K, Miyamoto T, Nishiwaki T, et al. Bidirectional ephrinB2-EphB4 signaling controls bone homeostasis. *Cell Metabolism.* août 2006;4(2):111-21.

62. Shapiro F, Wu JY. Woven bone overview: structural classification based on its integral role in developmental, repair and pathological bone formation throughout vertebrate groups. *Eur Cell Mater.* 1 oct 2019;38:137-67.

63. Baht G, Hunter G, Goldberg H. Bone sialoprotein–collagen interaction promotes

- hydroxyapatite nucleation. *Matrix Biology*. sept 2008;27(7):600-8.
64. Harmey D, Hesse L, Narisawa S, Johnson KA, Terkeltaub R, Millán JL. Concerted Regulation of Inorganic Pyrophosphate and Osteopontin by Akp2, Enpp1, and Ank. *The American Journal of Pathology*. avr 2004;164(4):1199-209.
65. Reznikov N, Hoac B, Buss DJ, Addison WN, Barros NMT, McKee MD. Biological stenciling of mineralization in the skeleton: Local enzymatic removal of inhibitors in the extracellular matrix. *Bone*. sept 2020;138:115447.
66. Sharma U, Pal D, Prasad R. Alkaline phosphatase: an overview. *Indian J Clin Biochem*. juill 2014;29(3):269-78.
67. Rosenthal AK, Ryan LM. Calcium Pyrophosphate Deposition Disease. *N Engl J Med*. 30 juin 2016;374(26):2575-84.
68. Ciosek Ż, Kot K, Kosik-Bogacka D, Łanocha-Arendarczyk N, Rotter I. The Effects of Calcium, Magnesium, Phosphorus, Fluoride, and Lead on Bone Tissue. *Biomolecules*. 28 mars 2021;11(4):506.
69. Peacock M. Calcium Metabolism in Health and Disease. *CJASN*. janv 2010;5(Supplement 1):S23-30.
70. Peacock M. Phosphate Metabolism in Health and Disease. *Calcif Tissue Int*. janv 2021;108(1):3-15.
71. Bienaimé F, Prié D, Friedlander G, Souberbielle JC. Vitamin D metabolism and activity in the parathyroid gland. *Mol Cell Endocrinol*. 5 déc 2011;347(1-2):30-41.
72. Goltzman D. Physiology of Parathyroid Hormone. *Endocrinol Metab Clin North Am*. déc 2018;47(4):743-58.
73. Weiss KH, Van de Moortele M, Gotthardt DN, Pfeiffenberger J, Seessle J, Ullrich E, et al. Bone demineralisation in a large cohort of Wilson disease patients. *J Inherit Metab Dis*. sept 2015;38(5):949-56.
74. Monir AU, Gundberg CM, Yagerman SE, van der Meulen MCH, Budell WC, Boskey AL, et al. The effect of lead on bone mineral properties from female adult C57/BL6 mice. *Bone*. nov 2010;47(5):888-94.
75. Ma Y, Ran D, Shi X, Zhao H, Liu Z. Cadmium toxicity: A role in bone cell function and teeth development. *Science of The Total Environment*. mai 2021;769:144646.
76. Goodman WG. Bone Disease and Aluminum: Pathogenic Considerations. *American Journal of Kidney Diseases*. nov 1985;6(5):330-5.
77. Liu R, Jin C, Wang Z, Wang Z, Wang J, Wang L. Effects of manganese

deficiency on the microstructure of proximal tibia and OPG/RANKL gene expression in chicks. *Vet Res Commun.* mars 2015;39(1):31-7.

78. Zheng J, Mao X, Ling J, He Q, Quan J. Low Serum Levels of Zinc, Copper, and Iron as Risk Factors for Osteoporosis: a Meta-analysis. *Biol Trace Elem Res.* juill 2014;160(1):15-23.

79. Dollwet HHA, Sorenson JRJ. Roles of copper in bone maintenance and healing. *Biol Trace Elem Res.* déc 1988;18(1):39-48.

80. Melton LJ. The Prevalence of Osteoporosis: Gender and Racial Comparison. *Calcif Tissue Int.* oct 2001;69(4):179-81.

81. Reginster JY, Burlet N. Osteoporosis: A still increasing prevalence. *Bone.* févr 2006;38(2):4-9.

82. Wilson S, Sharp CA, Davie MWJ. Health-related quality of life in patients with osteoporosis in the absence of vertebral fracture: a systematic review. *Osteoporos Int.* déc 2012;23(12):2749-68.

83. Leboime A, Confavreux CB, Mehse N, Paccou J, David C, Roux C. Osteoporosis and mortality. *Joint Bone Spine.* déc 2010;77:S107-12.

84. Flais J, Coiffier G, Le Noach J, Albert JD, Faccin M, Perdriger A, et al. Low prevalence of osteoporosis treatment in patients with recurrent major osteoporotic fracture. *Arch Osteoporos.* déc 2017;12(1):24.

85. Wibaux C, Baudens G, Cortet B, Philippe P, Flipo RM. Évaluation de la prise en charge de l'ostéoporose cortico-induite chez les patientes du réseau RIC-Nord-Pas-de-Calais. *Revue du Rhumatisme.* nov 2007;74(10-11):1035.

86. Fitzpatrick LA. Secondary Causes of Osteoporosis. *Mayo Clinic Proceedings.* mai 2002;77(5):453-68.

87. Spatz JM, Fields EE, Yu EW, Pajevic PD, Bouxsein ML, Sibonga JD, et al. Serum Sclerostin Increases in Healthy Adult Men during Bed Rest. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.* 1 sept 2012;97(9):E1736-40.

88. Vico L, Hargens A. Skeletal changes during and after spaceflight. *Nat Rev Rheumatol.* avr 2018;14(4):229-45.

89. Zerwekh JE, Ruml LA, Gottschalk F, Pak CYC. The Effects of Twelve Weeks of Bed Rest on Bone Histology, Biochemical Markers of Bone Turnover, and Calcium Homeostasis in Eleven Normal Subjects. *J Bone Miner Res.* 3 nov 2009;13(10):1594-601.

90. Peris P, Martínez-Ferrer A, Monegal A, Martínez de Osaba MJ, Muxi A, Guañabens N. 25 hydroxyvitamin D serum levels influence adequate response to bisphosphonate treatment in postmenopausal osteoporosis. *Bone*. juill 2012;51(1):54-8.
91. Souberbielle JC, Cormier C, Cavalier E, Breuil V, Debiais F, Fardellone P, et al. Vitamin D Supplementation in France in patients with or at risk for osteoporosis: Recent data and new practices. *Joint Bone Spine*. janv 2020;87(1):25-9.
92. Khan B, Nowson CA, Daly RM, English DR, Hodge AM, Giles GG, et al. Higher Dietary Calcium Intakes Are Associated With Reduced Risks of Fractures, Cardiovascular Events, and Mortality: A Prospective Cohort Study of Older Men and Women. *J Bone Miner Res*. oct 2015;30(10):1758-66.
93. Andrews NC. Disorders of iron metabolism. *N Engl J Med*. 23 déc 1999;341(26):1986-95.
94. Gulec S, Anderson GJ, Collins JF. Mechanistic and regulatory aspects of intestinal iron absorption. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 15 août 2014;307(4):G397-409.
95. Yanatori I, Kishi F. DMT1 and iron transport. *Free Radic Biol Med*. mars 2019;133:55-63.
96. Anderson GJ, Frazer DM, McKie AT, Vulpe CD, Smith A. Mechanisms of Haem and Non-Haem Iron Absorption: Lessons from Inherited Disorders of Iron Metabolism. *Biometals*. août 2005;18(4):339-48.
97. Hellman NE, Gitlin JD. Ceruloplasmin metabolism and function. *Annu Rev Nutr*. 2002;22:439-58.
98. Gomme PT, McCann KB, Bertolini J. Transferrin: structure, function and potential therapeutic actions. *Drug Discov Today*. 15 févr 2005;10(4):267-73.
99. Vogt ACS, Arsiwala T, Mohsen M, Vogel M, Manolova V, Bachmann MF. On Iron Metabolism and Its Regulation. *Int J Mol Sci*. 27 avr 2021;22(9):4591.
100. Elsayed ME, Sharif MU, Stack AG. Transferrin Saturation: A Body Iron Biomarker. *Adv Clin Chem*. 2016;75:71-97.
101. Ganz T. Hepcidin and iron regulation, 10 years later. *Blood*. 28 avr 2011;117(17):4425-33.
102. Nemeth E, Tuttle MS, Powelson J, Vaughn MB, Donovan A, Ward DM, et al. Hepcidin Regulates Cellular Iron Efflux by Binding to Ferroportin and Inducing Its

Internalization. *Science*. 17 déc 2004;306(5704):2090-3.

103. Camaschella C, Nai A, Silvestri L. Iron metabolism and iron disorders revisited in the hepcidin era. *Haematologica*. févr 2020;105(2):260-72.

104. Loréal O, Cavey T, Bardou-Jacquet E, Guggenbuhl P, Ropert M, Brissot P. Iron, hepcidin, and the metal connection. *Front Pharmacol*. 2014;5:128.

105. Brissot P, Ropert M, Le Lan C, Loréal O. Non-transferrin bound iron: a key role in iron overload and iron toxicity. *Biochim Biophys Acta*. mars 2012;1820(3):403-10.

106. Angoro B, Motshakeri M, Hemmaway C, Svirskis D, Sharma M. Non-transferrin bound iron. *Clin Chim Acta*. 1 juin 2022;531:157-67.

107. Bowers K, Srani SKS. The trafficking of metal ion transporters of the Zrt- and Irt-like protein family. *Traffic*. nov 2018;19(11):813-22.

108. Aydemir TB, Cousins RJ. The Multiple Faces of the Metal Transporter ZIP14 (SLC39A14). *The Journal of Nutrition*. 1 févr 2018;148(2):174-84.

109. Liuzzi JP, Aydemir F, Nam H, Knutson MD, Cousins RJ. Zip14 (Slc39a14) mediates non-transferrin-bound iron uptake into cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 12 sept 2006;103(37):13612-7.

110. Loréal O, Cavey T, Robin F, Kenawi M, Guggenbuhl P, Brissot P. Iron as a Therapeutic Target in HFE-Related Hemochromatosis: Usual and Novel Aspects. *Pharmaceuticals (Basel)*. 26 nov 2018;11(4).

111. Feder JN, Tsuchihashi Z, Irrinki A, Lee VK, Mapa FA, Morikang E, et al. The Hemochromatosis Founder Mutation in HLA-H Disrupts β 2-Microglobulin Interaction and Cell Surface Expression. *Journal of Biological Chemistry*. mai 1997;272(22):14025-8.

112. Schmidt PJ, Toran PT, Giannetti AM, Bjorkman PJ, Andrews NC. The Transferrin Receptor Modulates Hfe-Dependent Regulation of Hepcidin Expression. *Cell Metabolism*. mars 2008;7(3):205-14.

113. Silvestri L, Nai A, Dulja A, Pagani A. Hepcidin and the BMP-SMAD pathway: An unexpected liaison. In: *Vitamins and Hormones* [Internet]. Elsevier; 2019 [cité 21 mars 2022]. p. 71-99. Disponible sur: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0083672919300044>

114. Rausa M, Pagani A, Nai A, Campanella A, Gilberti ME, Apostoli P, et al. Bmp6 expression in murine liver non parenchymal cells: a mechanism to control their high iron exporter activity and protect hepatocytes from iron overload? *PLoS One*.

2015;10(4):e0122696.

115. Core AB, Canali S, Babitt JL. Hemojuvelin and bone morphogenetic protein (BMP) signaling in iron homeostasis. *Front Pharmacol* [Internet]. 13 mai 2014 [cité 22 avr 2022];5. Disponible sur:

<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fphar.2014.00104/abstract>

116. Meynard D, Kautz L, Darnaud V, Canonne-Hergaux F, Coppin H, Roth MP. Lack of the bone morphogenetic protein BMP6 induces massive iron overload. *Nat Genet.* avr 2009;41(4):478-81.

117. Andriopoulos B, Corradini E, Xia Y, Faasse SA, Chen S, Grgurevic L, et al. BMP6 is a key endogenous regulator of hepcidin expression and iron metabolism. *Nat Genet.* avr 2009;41(4):482-7.

118. Nemeth E, Rivera S, Gabayan V, Keller C, Taudorf S, Pedersen BK, et al. IL-6 mediates hypoferrremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin. *J Clin Invest.* mai 2004;113(9):1271-6.

119. Charlebois E, Pantopoulos K. Iron overload inhibits BMP/SMAD and IL-6/STAT3 signaling to hepcidin in cultured hepatocytes. Strnad P, éditeur. *PLoS ONE.* 23 juin 2021;16(6):e0253475.

120. Talbot NP, Lakhali S, Smith TG, Privat C, Nickol AH, Rivera-Ch M, et al. Regulation of hepcidin expression at high altitude. *Blood.* 19 janv 2012;119(3):857-60.

121. Piperno A, Galimberti S, Mariani R, Pelucchi S, Ravasi G, Lombardi C, et al. Modulation of hepcidin production during hypoxia-induced erythropoiesis in humans in vivo: data from the HIGHCARE project. *Blood.* 10 mars 2011;117(10):2953-9.

122. Nicolas G, Chauvet C, Viatte L, Danan JL, Bigard X, Devaux I, et al. The gene encoding the iron regulatory peptide hepcidin is regulated by anemia, hypoxia, and inflammation. *J Clin Invest.* oct 2002;110(7):1037-44.

123. Girelli D, Busti F, Brissot P, Cabantchik I, Muckenthaler MU, Porto G. Hemochromatosis classification: update and recommendations by the BIOIRON Society. *Blood.* 19 mai 2022;139(20):3018-29.

124. Wang CY, Core AB, Canali S, Zumbrennen-Bullough KB, Ozer S, Umans L, et al. Smad1/5 is required for erythropoietin-mediated suppression of hepcidin in mice. *Blood.* 6 juill 2017;130(1):73-83.

125. Steinbicker AU, Bartnikas TB, Lohmeyer LK, Leyton P, Mayeur C, Kao SM, et al. Perturbation of hepcidin expression by BMP type I receptor deletion induces iron

overload in mice. *Blood*. 13 oct 2011;118(15):4224-30.

126. Pietrangelo A. Hereditary hemochromatosis: pathogenesis, diagnosis, and treatment. *Gastroenterology*. août 2010;139(2):393-408, 408.e1-2.

127. Adams PC, Barton JC. How I treat hemochromatosis. *Blood*. 22 juill 2010;116(3):317-25.

128. Belhomme N, Morcet J, Lescoat A, Robin F, Deugnier Y, Bardou-Jacquet E, et al. Patient-reported outcomes and their relation with iron parameters in HFE haemochromatosis during maintenance therapy: A prospective cohort study. *Liver International*. 30 juin 2022;liv.15341.

129. Nemeth E. Heparin in β -thalassemia: Heparin in β -thalassemia. *Annals of the New York Academy of Sciences*. août 2010;1202(1):31-5.

130. Allali S, de Montalembert M, Brousse V, Chalumeau M, Karim Z. Management of iron overload in hemoglobinopathies. *Transfusion Clinique et Biologique*. sept 2017;24(3):223-6.

131. Camaschella C. Iron deficiency. *Blood*. 3 janv 2019;133(1):30-9.

132. Al-Naseem A, Sallam A, Choudhury S, Thachil J. Iron deficiency without anaemia: a diagnosis that matters. *Clin Med (Lond)*. mars 2021;21(2):107-13.

133. Premjeyanth V, Shipman A. Iron deficiency without anaemia. *Clin Med (Lond)*. juill 2021;21(4):e427.

134. Pasricha SR, Tye-Din J, Muckenthaler MU, Swinkels DW. Iron deficiency. *Lancet*. 16 janv 2021;397(10270):233-48.

135. Aksan A, Wohlrath M, Iqbal TH, Dignass A, Stein J. Inflammation, but Not the Underlying Disease or Its Location, Predicts Oral Iron Absorption Capacity in Patients With Inflammatory Bowel Disease. *J Crohns Colitis*. 13 mars 2020;14(3):316-22.

136. Illing AC, Shawki A, Cunningham CL, Mackenzie B. Substrate profile and metal-ion selectivity of human divalent metal-ion transporter-1. *J Biol Chem*. 31 août 2012;287(36):30485-96.

137. Davidson T, Chen H, Garrick MD, D'Angelo G, Costa M. Soluble nickel interferes with cellular iron homeostasis. *Mol Cell Biochem*. nov 2005;279(1-2):157-62.

138. Espinoza A, Le Blanc S, Olivares M, Pizarro F, Ruz M, Arredondo M. Iron, copper, and zinc transport: inhibition of divalent metal transporter 1 (DMT1) and human copper transporter 1 (hCTR1) by shRNA. *Biol Trace Elem Res*. mai 2012;146(2):281-6.

139. Fujishiro H, Yano Y, Takada Y, Tanihara M, Himeno S. Roles of ZIP8, ZIP14,

and DMT1 in transport of cadmium and manganese in mouse kidney proximal tubule cells. *Metallomics*. juill 2012;4(7):700-8.

140. Troadec MB, Ward DM, Lo E, Kaplan J, De Domenico I. Induction of FPN1 transcription by MTF-1 reveals a role for ferroportin in transition metal efflux. *Blood*. 25 nov 2010;116(22):4657-64.

141. Choi EK, Nguyen TT, Iwase S, Seo YA. Ferroportin disease mutations influence manganese accumulation and cytotoxicity. *FASEB J*. févr 2019;33(2):2228-40.

142. Jończy A, Mazgaj R, Smuda E, Żelazowska B, Kopeć Z, Starzyński RR, et al. The Role of Copper in the Regulation of Ferroportin Expression in Macrophages. *Cells*. 31 août 2021;10(9):2259.

143. Vashchenko G, MacGillivray RTA. Multi-copper oxidases and human iron metabolism. *Nutrients*. 27 juin 2013;5(7):2289-313.

144. Sakajiri T, Nakatsuji M, Teraoka Y, Furuta K, Ikuta K, Shibusa K, et al. Zinc mediates the interaction between ceruloplasmin and apo-transferrin for the efficient transfer of Fe(III) ions. *Metallomics*. 21 déc 2021;13(12):mfab065.

145. Kondaiah P, Sharp PA, Pullakhandam R. Zinc induces iron egress from intestinal Caco-2 cells via induction of Hephastin: A role for PI3K in intestinal iron absorption. *Biochem Biophys Res Commun*. 19 mars 2020;523(4):987-92.

146. Gunter TE, Gerstner B, Gunter KK, Malecki J, Gelein R, Valentine WM, et al. Manganese transport via the transferrin mechanism. *Neurotoxicology*. janv 2013;34:118-27.

147. Aschner M, Gannon M. Manganese (Mn) transport across the rat blood-brain barrier: Saturable and transferrin-dependent transport mechanisms. *Brain Research Bulletin*. janv 1994;33(3):345-9.

148. Leelakunakorn W, Sriworawit R, Soontaros S. Ceruloplasmin Oxidase Activity as a Biomarker of Lead Exposure. *Jrnl of Occup Health*. janv 2005;47(1):56-60.

149. Miquel G, Nekaa T, Kahn PH, Hémadi M, El Hage Chahine JM. Mechanism of formation of the complex between transferrin and bismuth, and interaction with transferrin receptor 1. *Biochemistry*. 23 nov 2004;43(46):14722-31.

150. El Hage Chahine JM, Hémadi M, Ha-Duong NT. Uptake and release of metal ions by transferrin and interaction with receptor 1. *Biochim Biophys Acta*. mars 2012;1820(3):334-47.

151. Vincent JB, Lukaski HC. Chromium. *Adv Nutr*. 1 juill 2018;9(4):505-6.

152. O'Neil-Cutting MA, Bomford A, Munro HN. Effect of excess dietary zinc on tissue storage of iron in rats. *J Nutr.* nov 1981;111(11):1969-79.
153. Smith T a. D. Human serum transferrin cobalt complex: stability and cellular uptake of cobalt. *Bioorg Med Chem.* 15 juill 2005;13(14):4576-9.
154. Herrera C, Pettiglio MA, Bartnikas TB. Investigating the role of transferrin in the distribution of iron, manganese, copper, and zinc. *J Biol Inorg Chem.* août 2014;19(6):869-77.
155. Gunshin H, Mackenzie B, Berger UV, Gunshin Y, Romero MF, Boron WF, et al. Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature.* 31 juill 1997;388(6641):482-8.
156. Balesaria S, Ramesh B, McArdle H, Bayele HK, Srai SKS. Divalent metal-dependent regulation of hepcidin expression by MTF-1. *FEBS Lett.* 19 févr 2010;584(4):719-25.
157. Ledesma-Colunga MG, Weidner H, Vujic Spasic M, Hofbauer LC, Baschant U, Rauner M. Shaping the bone through iron and iron-related proteins. *Seminars in Hematology.* juill 2021;58(3):188-200.
158. Liu G, Men P, Kenner GH, Miller SC. Age-associated iron accumulation in bone: implications for postmenopausal osteoporosis and a new target for prevention and treatment by chelation. *Biometals.* juin 2006;19(3):245-51.
159. Doyard M, Chappard D, Leroyer P, Roth MP, Loréal O, Guggenbuhl P. Decreased Bone Formation Explains Osteoporosis in a Genetic Mouse Model of Hemochromatosis. *PLoS One.* 2016;11(2):e0148292.
160. Doyard M, Fatih N, Monnier A, Island ML, Aubry M, Leroyer P, et al. Iron excess limits HHIP-2 gene expression and decreases osteoblastic activity in human MG-63 cells. *Osteoporos Int.* oct 2012;23(10):2435-45.
161. Guggenbuhl P, Fergelot P, Doyard M, Libouban H, Roth MP, Gallois Y, et al. Bone status in a mouse model of genetic hemochromatosis. *Osteoporos Int.* août 2011;22(8):2313-9.
162. Roodman GD. Osteoclasts Pump Iron. *Cell Metabolism.* mai 2009;9(5):405-6.
163. Kasai K, Hori MT, Goodman WG. Characterization of the transferrin receptor in UMR-106-01 osteoblast-like cells. *Endocrinology.* mars 1990;126(3):1742-9.
164. Yamasaki K, Hagiwara H. Excess iron inhibits osteoblast metabolism. *Toxicology Letters.* déc 2009;191(2-3):211-5.

165. He YF, Ma Y, Gao C, Zhao GY, Zhang LL, Li GF, et al. Iron overload inhibits osteoblast biological activity through oxidative stress. *Biol Trace Elem Res.* mai 2013;152(2):292-6.
166. Almeida M, Han L, Martin-Millan M, O'Brien CA, Manolagas SC. Oxidative Stress Antagonizes Wnt Signaling in Osteoblast Precursors by Diverting β -Catenin from T Cell Factor- to Forkhead Box O-mediated Transcription. *Journal of Biological Chemistry.* sept 2007;282(37):27298-305.
167. Xia D, Wu J, Xing M, Wang Y, Zhang H, Xia Y, et al. Iron overload threatens the growth of osteoblast cells via inhibiting the PI3K/AKT/FOXO3a/DUSP14 signaling pathway. *J Cell Physiol.* 29 janv 2019;
168. Zhao L, Wang Y, Wang Z, Xu Z, Zhang Q, Yin M. Effects of dietary resveratrol on excess-iron-induced bone loss via antioxidative character. *J Nutr Biochem.* nov 2015;26(11):1174-82.
169. Rached MT, Kode A, Xu L, Yoshikawa Y, Paik JH, Depinho RA, et al. FoxO1 is a positive regulator of bone formation by favoring protein synthesis and resistance to oxidative stress in osteoblasts. *Cell Metab.* 3 févr 2010;11(2):147-60.
170. Peltier L, Bendavid C, Cavey T, Island ML, Doyard M, Leroyer P, et al. Iron excess upregulates SPNS2 mRNA levels but reduces sphingosine-1-phosphate export in human osteoblastic MG-63 cells. *Osteoporos Int.* août 2018;29(8):1905-15.
171. Ishii K aki, Fumoto T, Iwai K, Takeshita S, Ito M, Shimohata N, et al. Coordination of PGC-1 β and iron uptake in mitochondrial biogenesis and osteoclast activation. *Nat Med.* mars 2009;15(3):259-66.
172. Gloire G, Legrand-Poels S, Piette J. NF- κ B activation by reactive oxygen species: Fifteen years later. *Biochemical Pharmacology.* nov 2006;72(11):1493-505.
173. Takayanagi H, Kim S, Koga T, Nishina H, Isshiki M, Yoshida H, et al. Induction and activation of the transcription factor NFATc1 (NFAT2) integrate RANKL signaling in terminal differentiation of osteoclasts. *Dev Cell.* déc 2002;3(6):889-901.
174. Boyce BF, Xiu Y, Li J, Xing L, Yao Z. NF- κ B-Mediated Regulation of Osteoclastogenesis. *Endocrinol Metab (Seoul).* 27 mars 2015;30(1):35-44.
175. Tsay J, Yang Z, Ross FP, Cunningham-Rundles S, Lin H, Coleman R, et al. Bone loss caused by iron overload in a murine model: importance of oxidative stress. *Blood.* 7 oct 2010;116(14):2582-9.
176. Yang J, Dong D, Luo X, Zhou J, Shang P, Zhang H. Iron Overload-Induced

- Osteocyte Apoptosis Stimulates Osteoclast Differentiation Through Increasing Osteocytic RANKL Production In Vitro. *Calcif Tissue Int.* nov 2020;107(5):499-509.
177. Guggenbuhl P, Filmon R, Mabileau G, Baslé MF, Chappard D. Iron inhibits hydroxyapatite crystal growth in vitro. *Metabolism.* juill 2008;57(7):903-10.
178. Li GF, Xu YJ, He YF, Du BC, Zhang P, Zhao DY, et al. Effect of hepcidin on intracellular calcium in human osteoblasts. *Mol Cell Biochem.* juill 2012;366(1-2):169-74.
179. Xu Y, Li G, Du B, Zhang P, Xiao L, Sirois P, et al. Hepcidin increases intracellular Ca²⁺ of osteoblast hFOB1.19 through L-type Ca²⁺ channels. *Regulatory Peptides.* déc 2011;172(1-3):58-61.
180. Zhang P, Xu Y jia, Zhao DY, Ma Y, Xiao L, Feng YS, et al. Increased intracellular iron and mineralization of cultured hFOB 1.19 cells following hepcidin activation through ferroportin-1. *Saudi Med J.* déc 2010;31(12):1303-8.
181. Zhao G yang, Di D hua, Wang B, Huang X, Xu Y jia. Effects of Mouse Hepcidin 1 Treatment on Osteoclast Differentiation and Intracellular Iron Concentration. *Inflammation.* avr 2015;38(2):718-27.
182. Jiang Y, Yan Y, Wang X, Zhu G, Xu YJ. Hepcidin inhibition on the effect of osteogenesis in zebrafish. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* juill 2016;476(1):1-6.
183. Jiang Y, Chen B, Yan Y, Zhu GX. Hepcidin protects against iron overload-induced inhibition of bone formation in zebrafish. *Fish Physiol Biochem.* févr 2019;45(1):365-74.
184. Sun L, Guo W, Yin C, Zhang S, Qu G, Hou Y, et al. Hepcidin deficiency undermines bone load-bearing capacity through inducing iron overload. *Gene.* juin 2014;543(1):161-5.
185. Shen GS, Yang Q, Jian JL, Zhao GY, Liu LL, Wang X, et al. Hepcidin1 Knockout Mice Display Defects in Bone Microarchitecture and Changes of Bone Formation Markers. *Calcif Tissue Int.* juin 2014;94(6):632-9.
186. Li G, Zhang H, Wu J, Wang A, Yang F, Chen B, et al. Hepcidin deficiency causes bone loss through interfering with the canonical Wnt/ β -catenin pathway via Forkhead box O3a. *Journal of Orthopaedic Translation.* juill 2020;23:67-76.
187. Zhang H, Wang A, Shen G, Wang X, Liu G, Yang F, et al. Hepcidin-induced reduction in iron content and PGC-1 β expression negatively regulates osteoclast

differentiation to play a protective role in postmenopausal osteoporosis. *Aging*. 30 avr 2021;13(8):11296-314.

188. Guggenbuhl P, Deugnier Y, Boisdet JF, Rolland Y, Perdriger A, Pawlotsky Y, et al. Bone mineral density in men with genetic hemochromatosis and HFE gene mutation. *Osteoporos Int*. déc 2005;16(12):1809-14.

189. Nguyen CD, Morel V, Pierache A, Lion G, Cortet B, Flipo RM, et al. Bone and joint complications in patients with hereditary hemochromatosis: a cross-sectional study of 93 patients. *Therapeutic Advances in Musculoskeletal*. janv 2020;12:1759720X2093940.

190. Zhang J, Zhao H, Yao G, Qiao P, Li L, Wu S. Therapeutic potential of iron chelators on osteoporosis and their cellular mechanisms. *Biomed Pharmacother*. mai 2021;137:111380.

191. Dixon SJ, Stockwell BR. The role of iron and reactive oxygen species in cell death. *Nat Chem Biol*. janv 2014;10(1):9-17.

192. Song H, Zhang S, Sun X, Liu J, Wu Y, Guo W, et al. Distinct Iron Deposition Profiles of Liver Zones in Various Models with Iron Homeostasis Disorders. *Adv Sci (Weinh)*. nov 2018;5(11):1800866.

193. Batts KP. Iron overload syndromes and the liver. *Mod Pathol*. févr 2007;20(S1):S31-9.

194. Klein GL. Aluminum toxicity to bone: A multisystem effect? *Osteoporosis and Sarcopenia*. mars 2019;5(1):2-5.

195. Chappard D, Bizot P, Mabilieu G, Hubert L. Aluminum and bone: Review of new clinical circumstances associated with Al³⁺ deposition in the calcified matrix of bone. *Morphologie*. juin 2016;100(329):95-105.

196. Hellström HO, Mjöberg B, Mallmin H, Michaëlsson K. No association between the aluminium content of trabecular bone and bone density, mass or size of the proximal femur in elderly men and women. *BMC Musculoskelet Disord*. 23 août 2006;7:69.

197. Cannata Andia JB. Aluminium toxicity: its relationship with bone and iron metabolism. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 1 janv 1996;11(supp3):69-73.

198. Buha A, Jugdaohsingh R, Matovic V, Bulat Z, Antonijevic B, Kerns JG, et al. Bone mineral health is sensitively related to environmental cadmium exposure-experimental and human data. *Environmental Research*. sept 2019;176:108539.

199. Wang N, Xie D, Wu J, Wu Z, He H, Yang Z, et al. Selenium and bone health: a protocol for a systematic review and meta-analysis. *BMJ Open*. oct 2020;10(10):e036612.
200. Yang T, Lee SY, Park KC, Park SH, Chung J, Lee S. The Effects of Selenium on Bone Health: From Element to Therapeutics. *Molecules*. 8 janv 2022;27(2):392.
201. Rayman MP. Selenium and human health. *Lancet*. 31 mars 2012;379(9822):1256-68.
202. van Dronkelaar C, van Velzen A, Abdelrazek M, van der Steen A, Weijs PJM, Tieland M. Minerals and Sarcopenia; The Role of Calcium, Iron, Magnesium, Phosphorus, Potassium, Selenium, Sodium, and Zinc on Muscle Mass, Muscle Strength, and Physical Performance in Older Adults: A Systematic Review. *J Am Med Dir Assoc*. janv 2018;19(1):6-11.e3.
203. Chen YL, Yang KC, Chang HH, Lee LT, Lu CW, Huang KC. Low serum selenium level is associated with low muscle mass in the community-dwelling elderly. *J Am Med Dir Assoc*. 2014;15(11):807-11.
204. Rederstorff M, Krol A, Lescure A. Understanding the importance of selenium and selenoproteins in muscle function. *Cell Mol Life Sci*. janv 2006;63(1):52-9.
205. Arnaud J, Akbaraly TN, Akbaraly NT, Hininger I, Roussel AM, Berr C. Factors associated with longitudinal plasma selenium decline in the elderly: the EVA study. *J Nutr Biochem*. juill 2007;18(7):482-7.

Titre : Mécanismes impliqués dans le développement de l'ostéoporose au cours des surcharges en fer

Mots clés : Surcharge en fer – Hémochromatose génétique – Ostéoporose – Métaux

Résumé : L'ostéoporose représente un problème de santé publique, particulièrement par l'intermédiaire de ses conséquences en termes de morbi-mortalité. La complication principale de cette maladie est la fracture, occasionnant un surrisque de décès et d'institutionnalisation. La surcharge en fer est une cause bien identifiée d'ostéoporose secondaire. L'intérêt pour cette cause secondaire de perte osseuse est renforcé par le fait que l'augmentation de la ferritinémie chez les femmes ménopausées serait associée à un excès de fragilité osseuse. Les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans l'ostéoporose liée au fer ne sont pas entièrement compris. Ceux-ci aboutissent à un déséquilibre de l'homéostasie osseuse, avec activation de la résorption et diminution de la formation osseuse. Notre objectif était d'étudier les rôles respectifs du fer lui-même, mais aussi de l'hepcidine, acteur central de la régulation du niveau de fer plasmatique, et des autres métaux interagissant avec le métabolisme du fer dans le développement de l'ostéoporose liée à la surcharge en fer.

En s'appuyant sur des modèles murins de surcharge en fer génétique (*Hfe*^{-/-}, *Bmp6*^{-/-}) ou secondaire (fer dextran), puis des modèles cellulaires, nos résultats suggèrent que le fer à lui-seul ne peut pas expliquer l'ensemble du phénotype osseux, avec une perte osseuse retrouvée exclusivement dans les modèles de surcharge génétique. La diminution de l'hepcidine dans les modèles génétiques pourrait avoir un rôle dans la perte osseuse, qui semble apparaître principalement par dépression ostéoblastique. Concernant les autres métaux, étudiés dans les mêmes modèles ainsi que chez l'humain, les observations montrent une différence de la concentration sérique des métaux entre les sexes avec des différences notables entre homme et femme, notamment concernant l'aluminium et le cadmium. L'ensemble de ce travail permet donc de préciser le mécanisme de la perte osseuse dans le cadre des surcharges en fer, avec potentiellement des applications pouvant s'étendre à la population générale, avec identification de groupes à risque.

Title: Mechanisms involved in the development of osteoporosis during iron overload

Keywords: Iron overload - Genetic haemochromatosis - Osteoporosis - Metals

Abstract: Osteoporosis is a public health problem, particularly through its consequences in terms of morbidity and mortality. The main complication of this disease is fracture, with an increased risk of death and institutionalization. Iron overload is a well identified cause of secondary osteoporosis. Interest in this secondary cause of bone loss is reinforced by the fact that increased ferritin levels in postmenopausal women seems to be associated with excess bone fragility. The cellular and molecular mechanisms involved in iron-related osteoporosis are not fully understood. These lead to an imbalance in bone homeostasis, with activation of resorption and reduction of bone formation. Our aim was to study the respective roles of iron itself, but also of hepcidin, a central player in the regulation of plasma iron levels, and of other metals interacting with iron metabolism in the development of iron overload-related osteoporosis.

Mice models of genetic (*Hfe*^{-/-}, *Bmp6*^{-/-}) or secondary (iron dextran) iron overload, and cellular models, suggest that iron alone cannot explain the bone phenotype, with bone loss found exclusively in models of genetic overload. The decrease of hepcidin level in the genetic models could have a role in the bone loss, which seems to occur mainly by osteoblastic depression. Concerning the other metals, studied in the same models as well as in humans, the observations show differences in serum concentration of metals between men and women, particularly concerning aluminum and cadmium. Our work allows to specify the mechanism of bone loss in the context of iron overload, with potential applications that could be extended to the general population, with the identification of risk groups.