



**HAL**  
open science

## L'innovation nutritionnelle au service de la prévention de l'ostéoporose. Cas de la fisétine : un polyphénol capable de protéger notre capital osseux

Laurent L. Leotoing, Cédric Darie, Jérôme Guicheux, Elisabeth Miot-Noirault, Véronique Coxam, Y. Wittrant

### ► To cite this version:

Laurent L. Leotoing, Cédric Darie, Jérôme Guicheux, Elisabeth Miot-Noirault, Véronique Coxam, et al.. L'innovation nutritionnelle au service de la prévention de l'ostéoporose. Cas de la fisétine : un polyphénol capable de protéger notre capital osseux. Innovations Agronomiques, 2014, 42, pp.39-46. 10.17180/ex7k-f855 . hal-02630394

**HAL Id: hal-02630394**

<https://hal.inrae.fr/hal-02630394v1>

Submitted on 27 May 2020

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

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



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0 International License

## **L'innovation nutritionnelle au service de la prévention de l'ostéoporose. Cas de la fisétine: un polyphénol capable de protéger notre capital osseux.**

Léotoing L.<sup>1</sup>, Darie C.<sup>1</sup>, Guicheux J.<sup>2</sup>, Miot-Noirault E.<sup>3</sup>, Coxam V.<sup>1</sup>, Wittrant Y.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> INRA, UMR 1019, CRNH Auvergne, Clermont Université, Université d'Auvergne, Unité de Nutrition Humaine, BP 10448, F-63000 Clermont-Ferrand

<sup>2</sup> Inserm, UMRS791, LIOAD, groupe STEP, PRES LUNAM, Université de Nantes, UFR Odontologie, 1 Place Alexis Ricordeau, F-44042 Nantes

<sup>3</sup> Inserm, UMR 990, F-63000 Clermont-Ferrand

Correspondance: yohann.wittrant@clermont.inra.fr

### **Résumé**

L'ostéoporose est la principale pathologie osseuse. Elle se traduit par un risque accru de fracture et impacte considérablement la qualité de vie. La prise en charge actuelle est limitée par une prophylaxie non systématique et les effets secondaires des traitements curatifs. Dans ce contexte d'abstention thérapeutique fréquente, l'utilisation de composés alimentaires végétaux représente une alternative innovante et prometteuse en raison de leurs propriétés biologiques spécifiques. Nous avons ainsi démontré le potentiel ostéoprotecteur de la fisétine (un polyphénol) et décrypté les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués. *In vivo*, la consommation de fisétine limite effectivement le processus d'ostéopénie consécutif à une carence œstrogénique ou une inflammation (deux modèles murins classiques pour l'étude de l'ostéoporose). De fait, la densité minérale osseuse, les paramètres micro-architecturaux et les biomarqueurs du métabolisme osseux sont positivement modulés par la fisétine. Ces données sont corroborées par l'induction *in vitro* de la différenciation de cellules souches en ostéoblastes et de leur activité, via la stimulation transcriptionnelle de Runx2. De plus, la fisétine réprime la différenciation et l'activité des ostéoclastes induite par RANKL (Receptor Activator of NfκB Ligand), comme démontré par une inhibition de la formation de cellules multinucléées, de l'activité de la Tartrate Resistant Acid Phosphatase (TRAP) et de l'expression des gènes de différenciation.

**Mots-clés** : tissu osseux, ostéoporose, nutrition, physiologie cellulaire

### **Abstract: Innovative Nutritional Prevention of Osteoporosis: the Polyphenol Fisetin Sustains Bone Health by Controlling Osteoblasts and Osteoclasts Differentiation**

Osteoporosis is a bone pathology leading to increased fracture risk and challenging quality of life. Since current treatments could exhibit deleterious side effects, the use of food compounds derived from plants represents a promising innovative alternative due to their potential therapeutic and preventive activities against human diseases. We demonstrated the ability of the polyphenol fisetin to counter osteoporosis and deciphered the cellular and molecular mechanisms involved. *In vivo*, fisetin consumption prevented bone loss in two common mice models for osteoporosis, namely estrogen deficiency and inflammation. Indeed, bone mineral density, micro-architecture parameters and bone markers were positively modulated by fisetin. Consistent with *in vivo* results, fisetin promoted primary preosteoblasts differentiation and activity by stimulating Runx2 transcriptional activity. Moreover, we showed that fisetin represses RANKL-induced osteoclast differentiation and activity as demonstrated by an inhibition of multinucleated cell formation, TRAP activity and expression of differentiation genes.

**Keywords**: bone, osteoporosis, nutrition, translational study

## Introduction

Avec l'évolution démographique de la population, tous les pays industrialisés sont confrontés à une prévalence croissante des pathologies liées à l'âge. Parmi ces maladies, l'ostéoporose est particulièrement invalidante. L'ostéoporose est un problème de santé publique majeur caractérisé par une masse osseuse réduite et la perturbation de l'architecture osseuse, entraînant une augmentation de la fragilité osseuse. Les professionnels de la santé déplorent le manque d'outils prophylactiques et le fait que seulement 10% des femmes avec des fractures suivent correctement leur traitement en raison de plusieurs effets secondaires. C'est pourquoi les autorités et les systèmes de santé publique recommandent fortement la mise en œuvre de nouvelles stratégies de valeur scientifique éprouvée.

### 1. Le remodelage osseux

L'homéostasie osseuse résulte des activités très contrôlées des ostéoblastes en charge de la formation osseuse et des ostéoclastes responsables de résorption osseuse. C'est le déséquilibre entre l'activité de ces deux types de cellules qui conduit à une densité minérale osseuse basse et une altération de la microarchitecture, deux caractéristiques de l'ostéoporose. La différenciation et l'activité des ostéoblastes et des ostéoclastes sont étroitement dépendantes des cytokines, des facteurs de croissance et des hormones qui activent des réseaux complexes de signalisation impliqués dans le processus de différenciation. Les **ostéoblastes** se différencient à partir de progéniteurs mésenchymateux sous la stimulation des protéines morphogéniques osseuses (BMP), l'hormone parathyroïdienne (PTH), Wnt ou Hedgehog (Soltanoff et al., 2009). L'intégration de ces signaux conduit à l'induction de facteurs de transcription, dont AP1, ATF4, osterix ou Runx2 (Schroeder et al., 2005 ; Marie, 2008) ). Runx2 joue un rôle essentiel dans la formation osseuse à travers le contrôle de la prolifération et de la différenciation cellulaire (Schroeder et al., 2005 ; Komori, 2010) et son invalidation génétique a révélé son rôle essentiel dans le développement osseux (Komori et al., 1997 ; Otto et al., 1997). Runx2 se lie aux promoteurs de plusieurs gènes, tels que l'ostéocalcine, collagène de type I ou l'ostéopontine pour induire leur expression et établir le phénotype des ostéoblastes. Les **ostéoclastes** sont des cellules géantes multinucléées dérivées de progéniteurs hématopoïétiques de la lignée monocyte / macrophage par un processus de différenciation principalement régie par deux cytokines clés: M-CSF et RANKL (Boyle et al., 2003 ; Asagiri et Takayanagi, 2007). M-CSF induit la prolifération des précurseurs d'ostéoclastes, soutient leur survie et stimule l'expression de RANK, le récepteur de RANKL. L'interaction entre le RANK et RANKL entraîne le recrutement de TRAF6 et l'activation de plusieurs voies de signalisation en aval, y compris NF- $\kappa$ B ainsi que la p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK), la c-jun-kinase N-terminal (JNK) et ERK (Matsumoto et al., 2000 ; Wei et al., 2001 ; David et al., 2002). NF- $\kappa$ B participe à l'induction précoce de NFATc1, un gène majeur de la différenciation des ostéoclastes (Takatsuna et al., 2005 ; Asagiri et Takayanagi, 2007). L'activation des MAPK entraîne la phosphorylation de c-jun et son association avec c-Fos pour former AP-1 facteur de transcription impliqué également dans l'induction de NFATc1 (Grigoriadis et al., 1994 ; Ikeda et al., 2008). NFATc1 régule ensuite la transcription de plusieurs gènes cibles tels que le récepteur de la calcitonine (CTR), la tartrate phosphatase acide résistante (TRAP), la métalloprotéinase matricielle 9 (MMP9) ou la cathepsine K qui participent au phénotype ostéoclastique (Asagiri et Takayanagi, 2007). En raison de la complexité du métabolisme osseux, il est clair que la prévention de l'ostéoporose ne peut pas reposer exclusivement sur le couple calcium et vitamine D.

### 2. Rôle de la prévention nutritionnelle de l'ostéoporose

Dans ce contexte, un nombre croissant de preuves a contribué à souligner l'importance des mesures préventives nutritionnelles pour la santé osseuse. En effet, la recherche en nutrition au cours des 30 dernières années a considérablement évolué pour soutenir l'hypothèse selon laquelle, en modulant les

fonctions de cibles spécifiques dans le corps, l'alimentation peut aider à atteindre une santé optimale en réduisant le risque de maladie. Une telle prévention par des moyens diététiques, si simple dans son concept, est particulièrement difficile dans les sociétés technologiquement avancées. Bien que le calcium et la vitamine D soient des nutriments essentiels pour le développement des os, il a été reconnu que l'alimentation humaine contient également un ensemble complexe de molécules bioactives d'origine naturelle dotées de propriétés spécifiques contribuant également à la santé osseuse. Le travail décrit ci-dessous a cherché à développer une approche nutritionnelle ciblant de nouvelles voies impliquées dans la perte osseuse. Nous avons donc considéré l'intérêt de nutriments dotés de propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires. En utilisant des approches translationnelles, nous avons démontré qu'un polyphénol module positivement la physiologie osseuse et empêche les atteintes osseuses résultant de la carence en œstrogènes ou induites par une inflammation.

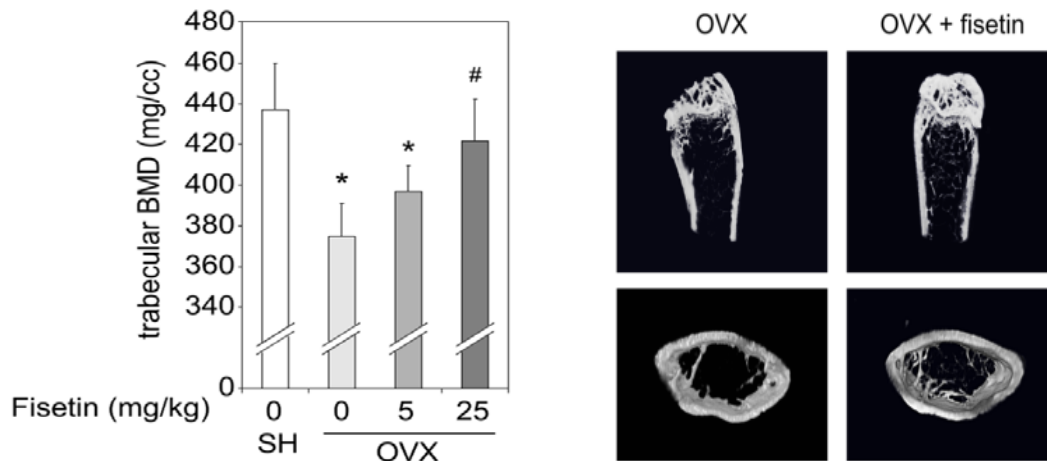
### 3. Polyphénols et santé osseuse

Les polyphénols représentent une large classe de composés phénoliques que l'on trouve couramment dans les plantes. À ce jour, plus de 4 000 composés différents ont été identifiés et sont classés selon leur structure chimique; ce sont les flavonols, les flavones, les flavanones, les isoflavones, les flavanols et les anthocyanes. La consommation de flavonoïdes a été reliée à différents bénéfices pour la santé chez les humains et les animaux, y compris la protection contre les maladies cardiaques (Quinones et al., 2013), l'amélioration du contrôle glycémique (Nicolle et al., 2011), le retard des dysfonctionnements cognitifs (Williams et Spencer, 2012) ou la préservation du capital osseux (Horcajada-Molteni et al., 2000). Ils exercent leurs effets biologiques par une grande variété de mécanismes d'action. Par exemple, les isoflavones de soja, la génistéine ou la daidzéine peuvent directement se lier aux récepteurs des œstrogènes  $\alpha$   $\beta$  et activer leur activité transcriptionnelle, ce qui entraîne des effets sur un grand nombre de systèmes régulés par les œstrogènes (Cederroth et Nef, 2009). D'autres, comme l'épigallocatechine-gallate (EGCG) trouvée dans le thé vert, ont à la fois des activités pro et anti-oxydantes, anti-inflammatoires en partie grâce à la modulation du système NF- $\kappa$ B et régulent de nombreuses voies de signalisation intracellulaire impliquées dans le cycle cellulaire, l'apoptose, la croissance cellulaire ou l'angiogenèse (Singh et al., 2011). Chez la ratte ovariectomisée, la supplémentation en un glycoside de quercétine (rutine), à 10 mg/kg / jour pendant trois mois, aide à prévenir la déminéralisation induite par la carence en œstrogènes (Horcajada-Molteni et al., 2000 ; Horcajada-Molteni et Coxam, 2001). Tsuji et al. (2005) ont confirmé ces résultats chez la souris ovariectomisées C57BL6J. L'approche *in vitro* indique que cet effet résulte d'une réduction de la différenciation des ostéoclastes (Tsuji et al., 2005 ; Wattel et al., 2003). Par ailleurs, d'autres études ont démontré que l'épigallocatechine-3-gallate, le kaempférol, la phloridzine protègent de l'ostéoporose (Chen et al., 2013 ; Trivedi et al, 2008 ; Puel et al., 2005). Enfin, chez les humains, il a été montré qu'une alimentation riche en flavonoïdes est positivement associée à la densité minérale vertébrale (Welch et al., 2012).

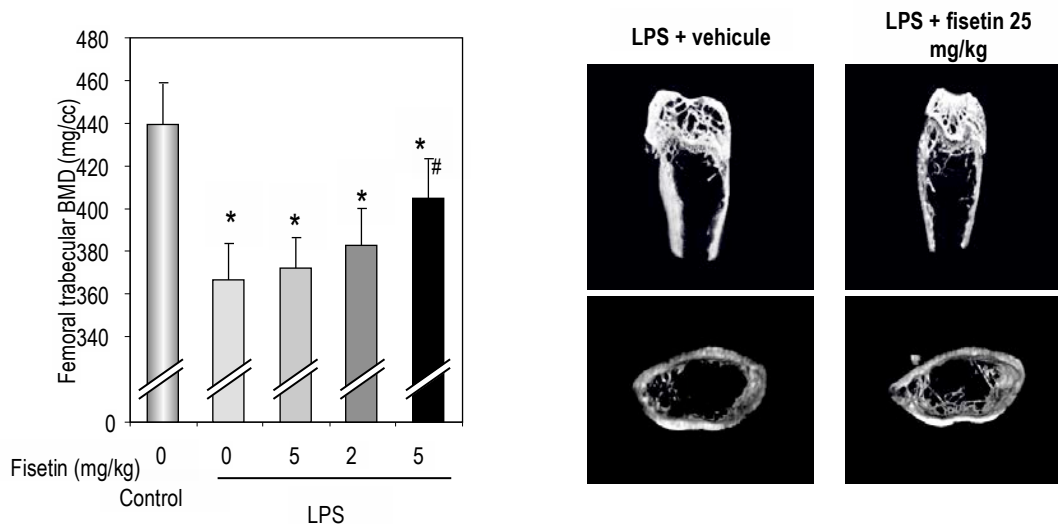
### 4. La fisétine, un outil innovant pour prévenir l'ostéoporose

La fisétine est un polyphénol (3,7,3',4'-tétrahydroxyflavone) qui appartient à la sous-classe des flavonols comme la quercétine, le kaempférol ou la myricétine. La fisétine se trouve dans les plantes telles que *Rhus verniciflua* et des légumes et fruits consommés quotidiennement tels que le kaki, la pomme, la fraise à une concentration allant de 2 à 160 mg/kg (Arai et al., 2000). Elle a déjà été décrite comme ayant de multiples activités biologiques bénéfiques, y compris l'inhibition de la croissance du cancer de la prostate (Khan et al., 2008), la neuroprotection (Maher et al., 2006 ; Maher et al., 2011) ou la prévention de la polyarthrite rhumatoïde (Lee et al., 2009). *In vitro*, la fisétine a été décrite pour exercer une grande variété d'activités: pro-apoptotique dans les cellules cancéreuses du poumon et de la prostate, anti-oxydante dans l'épithélium de la rétine et des cellules neuronales ou anti-inflammatoires

dans les macrophages et les fibroblastes. Comme l'inflammation exerce un rôle essentiel dans l'ostéoporose post-ménopausique, nous avons supposé que la fisétine peut contrer la perte osseuse dans différents modèles murins : carence en œstrogènes et ostéoporose induite par l'inflammation. *In vivo*, nous avons démontré que la fisétine empêche la perte osseuse à la fois liée à l'ovariectomie et celle induite par une inflammation aiguë (modèle d'injection de LPS- lipopolysaccharides) (Liu et al., 2010). Dans ces travaux, la densité minérale osseuse, les paramètres micro-architecture et marqueurs osseux ont été positivement modulés par la fisétine (Figure 1A et 1B).



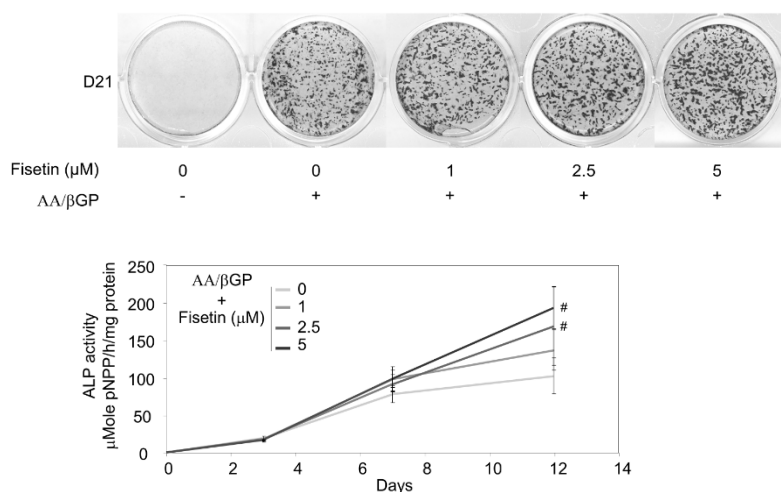
**Figure 1A :** La fisétine prévient la perte osseuse chez les souris ayant subi une ovariectomie (un modèle animal pour l'étude de l'ostéoporose), d'une manière dépendante de la dose. Une semaine avant l'ovariectomie, des souris ( $n = 12$  / groupe) ont reçu par voie orale de la fisétine à 5 et 25 mg / kg ou un placebo. Les animaux ont été soumis à l'opération fictive (SH) ou ovariectomie (OVX), puis la fisétine ou le placebo ont été administrés par voie orale pendant 4 semaines. (\*) Significativement différent de SH,  $p \leq 0,05$ , (#) significativement différent de OVX seul,  $p \leq 0,05$ .



**Figure 1B :** La fisétine prévient la perte osseuse chez la souris lors d'une inflammation aiguë (censée provoquer une ostéopénie), d'une manière dépendante de la dose. Une semaine avant l'injection de LPS, les souris ( $n = 12$  / groupe) ont reçu par voie orale de la fisétine ou un placebo à 5, 25 et 50 mg / kg. Le véhicule (PBS) ou un lipopolysaccharide (LPS-25 mg / kg) ont été injectés par voie sous-cutanée une fois par semaine pendant 3 semaines sur la calotte de souris recevant par voie orale la fisétine à 5, 25 et 50 mg / kg. (\*) Significativement différent de contrôle,  $p < 0,05$ , (#) significativement différent de LPS-seul,  $p < 0,05$ .

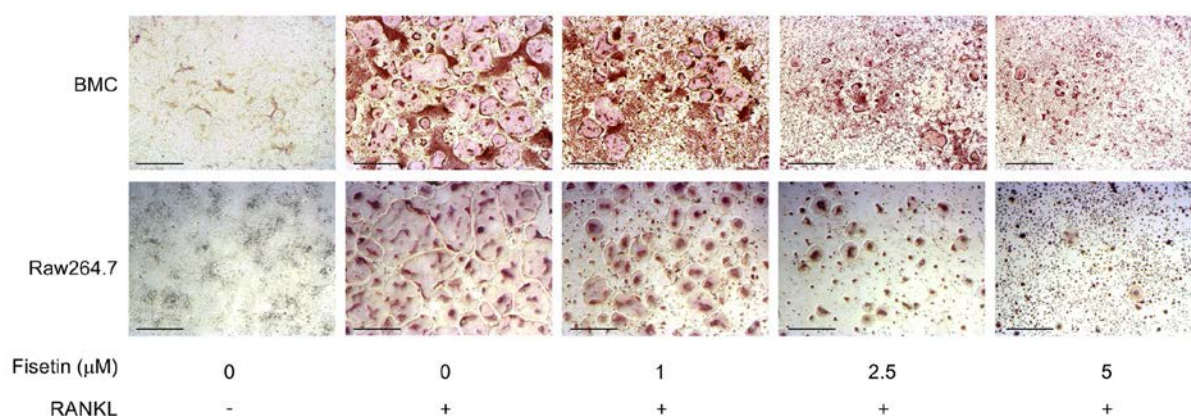
Ce composé très puissant présente un double rôle en favorisant à la fois l'activité des ostéoblastes et la répression de la différenciation des ostéoclastes, à la fois *in vivo* et *in vitro*. Le mécanisme d'action

complet a été déchiffré. La fisétine favorise la différenciation et l'activité de pré-ostéoblastes primaires en stimulant l'activité transcriptionnelle de Runx2 (Figure 2).



**Figure 2:** La fisétine stimule le processus de minéralisation des ostéoblastes. Des cultures primaires de pré-ostéoblastes de rats ont été stimulés avec de l'acide ascorbique et du bétaglycérophosphpate pour induire la minéralisation en présence de placebo ou de la fisétine (1 à 5 µmol/L). Après 9, 13, 17 et 21 jours de culture, la zone minéralisée a été colorée avec l'alizarine rouge. La zone minéralisée a été quantifiée en utilisant le logiciel Image J. De la même façon, après 0, 3, 7 et 12 jours, l'activité de la phosphatase alcaline a été mesurée. (\*) Significativement différente de contrôle,  $p < 0.05$ , (#) significativement différent de AA / βGP-fisétine 0 µmol/L,  $p < 0.05$ .

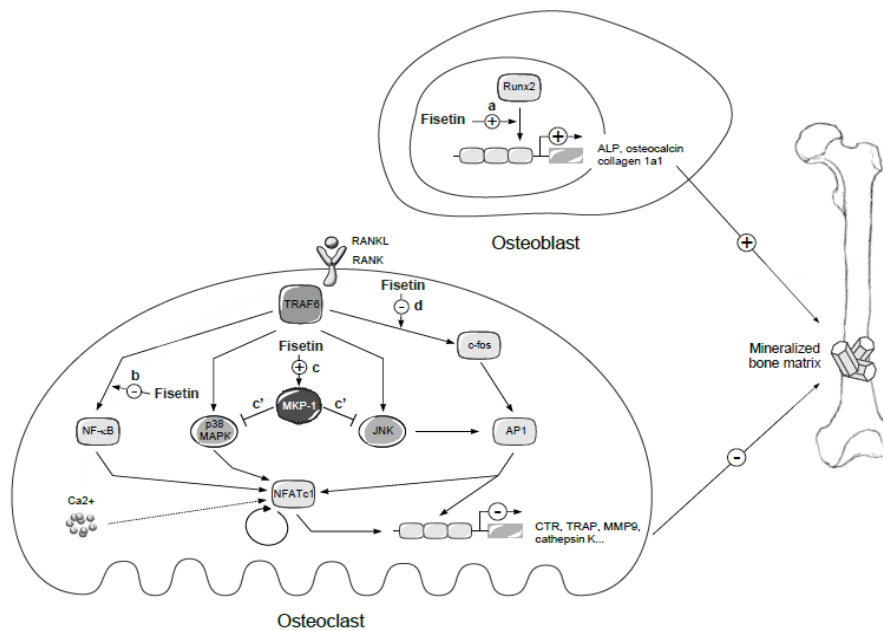
En outre, la fisétine est capable de réprimer la différenciation des ostéoclastes induite par RANKL ainsi que démontré par une inhibition de la fusion cellulaire et de l'activité de TRAP (Figure 3).



**Figure 3 :** Les précurseurs d'ostéoclastes RAW264.7 ont été pré-incubés avec le véhicule ou des doses différentes de fisétine pendant 3 heures, puis induites à se différencier en présence de RANKL avec ou sans 1 à 5 µmol/L de fisétine.

Enfin, toutes les voies de signalisation impliquées dans l'inhibition de la différenciation ostéoclastique sont intégrées au niveau de la Figure 4. L'utilisation de technologies d'inactivation d'expression génique par shRNA et la production de lignées cellulaires stables, ont en outre permis de démontrer que

l'activité de la fisétine est médiée par MKP-1, la phosphatase qui désactive p38 et JNK. Ainsi, la fisétine devrait être davantage considérée comme un agent de protection osseuse.



**Figure 4:** Voies moléculaires par lesquelles la fisétine contrôle la physiologie osseuse.

**En conclusion, ce travail présente un intérêt majeur pour :**

- Le Monde de la recherche: concept scientifique innovant combiné à une approche scientifique solide ;
- Les Autorités et les systèmes de santé publique: nécessité d'alternatives validées (les stratégies actuelles reposent principalement sur les thérapies à base de médicaments curatifs qui ont montré des effets secondaires délétères) ;
- Les Consommateurs: nouvelles options de prévention pour améliorer la santé et la qualité de vie ;
- Le Secteur industriel: projet fondé sur la science dans un marché en plein essor.

**Références bibliographiques**

Arai Y., Watanabe S., Kimira M., Shimoi K., Mochizuki R., Kinae N., 2000. Dietary intakes of flavonols, flavones and isoflavones by Japanese women and the inverse correlation between quercetin intake and plasma LDL cholesterol concentration. *J Nutr* 130, 2243-2250.

Asagiri M., Takayanagi H., 2007. The molecular understanding of osteoclast differentiation. *Bone* 40, 251-264.

Boyle W.J., Simonet W.S., Lacey D.L., 2003. Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 423, 337-342.

Cederroth C.R., Nef S., 2009. Soy, phytoestrogens and metabolism: A review. *Mol Cell Endocrinol* 304, 30-42.

Chen C.H., Kang L., Lin R.W., Fu Y.C., Lin Y.S., Chang J.K., Chen H.T., Chen C.H., Lin S.Y., Wang G.J., Ho M.L., 2013. (-)-Epigallocatechin-3-gallate improves bone microarchitecture in ovariectomized rats. *Menopause* 20, 687-694.



- David J.P., Sabapathy K., Hoffmann O., Idarraga M.H., Wagner E.F., 2002. JNK1 modulates osteoclastogenesis through both c-Jun phosphorylation-dependent and -independent mechanisms. *J Cell Sci* 115, 4317-4325.
- Grigoriadis A.E., Wang Z.Q., Cecchini M.G., Hofstetter W., Felix R., Fleisch H.A., Wagner E.F., 1994. c-Fos: a key regulator of osteoclast-macrophage lineage determination and bone remodeling. *Science* 266, 443-448.
- Horcajada-Molteni M.N., Crespy V., Coxam V., Davicco M.J., Remesy C., Barlet J.P., 2000. Rutine inhibits ovariectomy-induced osteopenia in rats. *J Bone Miner Res* 15, 2251-2258.
- Horcajada-Molteni M.N., Coxam V., 2001. Flavonols and isoflavones prevent bone loss in the ovariectomized rat, a model for postmenopausal osteoporosis. In: *Nutritional aspects of osteoporosis*. F Burkhardt (ed.), Academic Press, pp 325-340.
- Ikeda F., Matsubara T., Tsurukai T., Hata K., Nishimura R., Yoneda T., 2008. JNK/c-Jun signaling mediates an anti-apoptotic effect of RANKL in osteoclasts. *J Bone Miner Res* 23, 907-914.
- Khan N., Asim M., Afaq F., Abu Zaid M., Mukhtar H. A., 2008. Novel dietary flavonoid fisetin inhibits androgen receptor signaling and tumor growth in athymic nude mice. *Cancer Res* 68, 8555-8563.
- Komori T., 2010. Regulation of bone development and extracellular matrix protein genes by RUNX2. *Cell Tissue Res* 339, 189-195.
- Komori T., Yagi H., Nomura S., Yamaguchi A., Sasaki K., Deguchi K., Shimizu Y., Bronson R.T., Gao Y.H., Inada M., Sato M., Okamoto R., Kitamura Y., Yoshiki S., Kishimoto T., 1997. Targeted disruption of *Cbfa1* results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell* 89, 755-764.
- Lee J.D., Huh J.E., Jeon G., Yang H.R., Woo H.S., Choi D.Y., Park D.S., 2009. Flavonol-rich RVHxR from *Rhus verniciflua* Stokes and its major compound fisetin inhibits inflammation-related cytokines and angiogenic factor in rheumatoid arthritic fibroblast-like synovial cells and in vivo models. *Int Immunopharmacol* 9, 268-276.
- Liu S.H., Lin C.H., Hung S.K., Chou J.H., Chi C.W., Fu S.L., 2010. Fisetin Inhibits Lipopolysaccharide-Induced Macrophage Activation and Dendritic Cell Maturation. *J Agric Food Chem* 58, 10831-10839.
- Maher P., Akaiishi T., Abe K., 2006. Flavonoid fisetin promotes ERK-dependent long-term potentiation and enhances memory. *Proc Natl Acad Sci USA* 103, 16568-16573.
- Maher P., Dargusch R., Bodai L., Gerard P.E., Purcell J.M., Marsh J.L., 2011. ERK activation by the polyphenols fisetin and resveratrol provides neuroprotection in multiple models of Huntington's disease. *Hum Mol Genet* 20, 261-270.
- Marie P.J., 2008. Transcription factors controlling osteoblastogenesis. *Arch Biochem Biophys* 473, 98-105.
- Matsumoto M., Sudo T., Saito T., Osada H., Tsujimoto M., 2000. Involvement of p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathway in osteoclastogenesis mediated by receptor activator of NF-kappa B ligand (RANKL). *J Biol Chem* 275, 31155-31161.
- Nicolle E., Souard F., Faure P., Boumendjel A., 2011. Flavonoids as promising lead compounds in type 2 diabetes mellitus: molecules of interest and structure-activity relationship. *Curr Med Chem* 18, 2661-2672.
- Otto F., Thornell A.P., Crompton T., Denzel A., Gilmour K.C., Rosewell I.R., Stamp G.W., Beddington R.S., Mundlos S., Olsen B.R., Selby P.B., Owen M.J., 1997. *Cbfa1*, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell* 89, 765-771.
- Puel C., Quintin A., Mathey J., Obled C., Davicco M.J., Lebecque P., Kati-Coulibaly S., Horcajada M.N., Coxam V., 2005. Prevention of bone loss by phloridzin, an apple polyphenol, in ovariectomized rats under inflammation conditions. *Calcif Tissue Int* 77, 311-318.
- Quinones M., Miguel M., Aleixandre A., 2013. Beneficial effects of polyphenols on cardiovascular disease. *Pharmacol Res* 68, 125-131.
- Singh B.N., Shankar S., Srivastava R.K., 2011. Green tea catechin, epigallocatechin-3-gallate (EGCG): mechanisms, perspectives and clinical applications. *Biochem Pharmacol* 82, 1807-1821.



- Schroeder T.M., Jensen E.D., Westendorf J.J., 2005. Runx2: a master organizer of gene transcription in developing and maturing osteoblasts. *Birth Defects Res C Embryo Today* 75, 213-225.
- Soltanoff C.S., Yang S., Chen W., Li Y.P., 2009. Signaling networks that control the lineage commitment and differentiation of bone cells. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 19, 1-46.
- Takatsuna H., Asagiri M., Kubota T., Oka K., Osada T., Sugiyama C., Saito H., Aoki K., Ohya K., Takayanagi H., Umezawa K., 2005. Inhibition of RANKL -induced osteoclastogenesis by (-)-DHMEQ, a novel NF-kappaB inhibitor, through downregulation of NFATc1. *J Bone Miner Res* 20, 653-662.
- Trivedi R., Kumar S., Kumar A., Siddiqui J.A., Swarnkar G., Gupta V., Kendurker A., Dwivedi A.K., Romero J.R., Chattopadhyay N., 2008. Kaempferol has osteogenic effect in ovariectomized adult Sprague-Dawley rats. *Mol Cell Endocrinol* 289, 85-93.
- Tsuji M., Yamamoto H., Sato T., Taketani Y., Kato S., Inakuma T., Takeda E., 2005. Dietary onion quercetin inhibits bone loss in ovariectomized mice. *J Bone Miner Res* 20 (Suppl1), M328.
- Wattel A., Kamel S., Mentaverri R., Lorget F., Prouillet C., Petit J.P., Fardelonne P., Brazier M., 2003. Potent inhibitory effect of naturally occurring flavonoids quercetin and kampferol on *in vitro* osteoclastic bone resorption. *Biochem Pharmacol* 65, 35-42.
- Wei S., Teitelbaum S.L., Wang M.W., Ross F.P., 2001. Receptor activator of nuclear factor-kappa b ligand activates nuclear factor-kappa b in osteoclast precursors. *Endocrinology* 142, 1290-1295.
- Welch A., MacGregor A., Jennings A., Fairweather-Tait S., Spector T., Cassidy A., 2012. Habitual flavonoid intakes are positively associated with bone mineral density in women. *J Bone Miner Res* 27, 1872-1878.
- Williams R.J., Spencer J.P., 2012. Flavonoids, cognition, and dementia: actions, mechanisms, and potential therapeutic utility for Alzheimer disease. *Free Radic Biol Med* 52, 35-45.